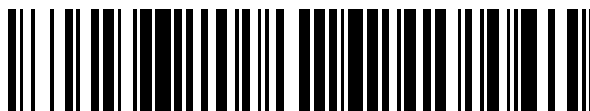


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 563 483**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2009 E 09729337 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2275443**

54 Título: **Molécula de unión a antígeno capaz de unirse repetidamente a dos o más moléculas de antígeno**

30 Prioridad:

11.04.2008 JP 2008104147

26.09.2008 JP 2008247713

19.03.2009 JP 2009068744

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.03.2016

73 Titular/es:

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)

5-1, Ukima 5-chome Kita-ku

Tokyo 115-8543, JP

72 Inventor/es:

IGAWA, TOMOYUKI;

ISHII, SHINYA;

MAEDA, ATSUHIKO y

NAKAI, TAKASHI

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 563 483 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Molécula de unión a antígeno capaz de unirse repetidamente a dos o más moléculas de antígeno

Campo técnico

5 La presente descripción se refiere a métodos para mejorar la farmacocinética de moléculas de unión al antígeno y métodos para aumentar la cantidad de veces de unión al antígeno de moléculas de unión al antígeno, así como moléculas de unión al antígeno con mejor farmacocinética, moléculas de unión al antígeno con una mayor cantidad de veces de unión al antígeno, y métodos para producir dichas moléculas.

Antecedentes de la técnica

10 Los anticuerpos están captando atención como agentes farmacéuticos ya que son muy estables en plasma y presentan pocos efectos adversos. Actualmente, se encuentra disponible una cantidad de agentes farmacéuticos de anticuerpo tipo IgG en el mercado y actualmente se están desarrollando muchos más agentes farmacéuticos de anticuerpo (documentos no patentados 1 y 2). Mientras tanto, se han desarrollado varias tecnologías aplicables a agentes farmacéuticos de anticuerpo de segunda generación, incluidas las que mejoran la función efectora, la capacidad de unión al antígeno, la farmacocinética, y la estabilidad, y las que reducen el riesgo de inmunogenicidad (documento no patentado 3). En general, la dosis requerida de un agente farmacéutico de anticuerpo es muy alta. Esto, a su vez, ha conllevado problemas, como el costo alto de producción, así como la dificultad para producir formulaciones subcutáneas. En la teoría, se puede reducir la dosis de un agente farmacéutico de anticuerpo mediante la mejora de la farmacocinética del anticuerpo o mediante la mejora de la afinidad entre los anticuerpos y los antígenos.

20 La bibliografía ha registrado métodos para mejorar la farmacocinética del anticuerpo usando sustitución artificial de aminoácidos en regiones constantes (documentos no patentados 4 y 5). De manera similar, se ha registrado la maduración de la afinidad como tecnología para mejorar la capacidad de unión al antígeno o actividad de neutralización del antígeno (documento no patentado 6). Esta tecnología permite la mejora de la actividad de unión al antígeno mediante la introducción de mutaciones de aminoácidos en la región CDR de una región variable o similar. La mejora de la capacidad de unión al antígeno permite mejorar la actividad biológica *in vitro* o reducir la dosificación, y permite además mejorar la eficacia *in vivo* (documento no patentado 7).

La capacidad de neutralización del antígeno de una única molécula de anticuerpo depende de su afinidad. Al aumentar la afinidad, se puede neutralizar el antígeno con una menor cantidad de un anticuerpo.

30 Se pueden utilizar varios métodos para mejorar la afinidad del anticuerpo. Además, si la afinidad pudiera volverse infinita mediante la unión covalente del anticuerpo al antígeno, una única molécula de anticuerpo podría neutralizar una molécula del antígeno (un anticuerpo divalente podría neutralizar dos moléculas del antígeno). Sin embargo, la neutralización estequiométrica de un anticuerpo contra un antígeno (un anticuerpo divalente contra dos antígenos) es el límite de los métodos preexistentes y, por lo tanto, es imposible neutralizar por completo el antígeno con la menor cantidad de anticuerpo que la cantidad de antígeno. En otras palabras, el efecto de aumento de la afinidad tiene un límite (documento no patentado 9). A los efectos de prolongar el efecto de neutralización de un anticuerpo de neutralización durante un periodo determinado, el anticuerpo debe administrarse en una dosis superior a la cantidad de antígeno producido en el cuerpo durante el mismo periodo. Con la mejora de la farmacocinética del anticuerpo o la tecnología de maduración de la afinidad por sí sola que se describió anteriormente, existe, por lo tanto, una limitación en la reducción de la dosis de anticuerpo requerida.

40 Por consiguiente, a los efectos de sostener el efecto de neutralización del antígeno que presenta el anticuerpo durante un periodo diana con una menor cantidad del anticuerpo que la cantidad del antígeno, un único anticuerpo debe neutralizar varios antígenos. Los métodos para neutralizar varios antígenos con un único anticuerpo incluyen la inactivación del antígeno usando anticuerpos catalíticos, que son anticuerpos que presentan una función catalítica. Cuando el antígeno es una proteína, se puede inactivar mediante la hidrólisis de sus enlaces peptídicos. Un anticuerpo puede neutralizar antígenos de forma reiterada mediante catálisis de dicha hidrólisis (documento no patentado 8). Existen muchos registros previos publicados sobre anticuerpos catalíticos y las tecnologías para producirlos. Sin embargo, no ha habido registros de anticuerpos catalíticos con suficiente actividad catalítica como agente farmacéutico. De manera específica, en un estudio de anticuerpos *in vivo* para determinado antígeno, no ha habido publicaciones sobre anticuerpos catalíticos que puedan producir un efecto comparable o más fuerte incluso en dosis bajas o producir un efecto más prolongado incluso en una misma dosis en comparación con un anticuerpo de neutralización no catalítico común.

50 Como se describió anteriormente, no ha habido registros de anticuerpos que puedan producir un efecto *in vivo* más superior que los anticuerpos de neutralización comunes mediante la neutralización de varias moléculas de antígeno por parte de un único anticuerpo. Por lo tanto, desde el punto de vista de la reducción de la dosis y de la prolongación de la duración, existe la necesidad de nuevas tecnologías que permitan la producción de nuevas moléculas de anticuerpo con un efecto *in vivo* más potente que los anticuerpos de neutralización comunes mediante la neutralización individual de varias moléculas de antígeno.

Los documentos de la técnica anterior pertinentes a la presente descripción se muestran a continuación:

[Documentos no patente]

Documento no patentado 1: Monoclonal antibody successes in the clinic. Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, *Nature Biotechnology* 23, 1073-1078 (2005)

Documento no patentado 2: Pavlou AK, Belsey MJ. The therapeutic antibodies market to 2008. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005 Apr;59(3):389-96

Documento no patentado 3: Kim SJ, Park Y, Hong HJ. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Mol Cells.* 2005 Aug 31;20(1):17-29. Review

Documento no patentado 4: Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N. An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life. *J Immunol.* 2006 Jan 1;176(1):346-56

Documento no patentado 5: Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES. Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. *Nat Biotechnol.* 1997 Jul;15(7):637-40

Documento no patentado 6: Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R. A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jun 14;102(24):8466-71. Epub 2005 Jun 6

Documento no patentado 7: Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, White WI, Young JF, Kiener PA. Development of Motavizumab, an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract. *J Mol Biol.* 2007, 368, 652-665

Documento no patentado 8: Hanson CV, Nishiyama Y, Paul S. Catalytic antibodies and their applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2005 Dec;16(6):631-6

Documento no patentado 9: Rathanaswami P, Roalstad S, Roskos L, Su QJ, Lackie S, Babcook J. Demonstration of an in vivo generated sub-picomolar affinity fully human monoclonal antibody to interleukin-8. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Sep 9;334(4):1004-13

Documento no patentado 10: Ito W, et al, *FEBS Letters*, 1992 Aug;309(1):85-88

Compendio

5 Problemas a resolver

Las circunstancias mencionadas anteriormente llevaron a los descubrimientos descritos en la presente memoria.

Por consiguiente, un objetivo de la presente descripción es proporcionar métodos de unión de las moléculas de unión al antígeno con los antígenos varias veces y métodos para mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno, así como moléculas de unión al antígeno que puedan unirse a los antígenos varias veces, moléculas de unión al antígeno con mejor farmacocinética, composiciones farmacéuticas que contienen dichas moléculas de unión al antígeno, y métodos para producir dichas moléculas y composiciones.

La invención se refiere a las realizaciones como se define en las reivindicaciones.

En particular, la invención se refiere a un método para mejorar la farmacocinética de un anticuerpo que comprende sustituir al menos un aminoácido de una CDR del anticuerpo con una histidina, o insertar al menos una histidina en una CDR del anticuerpo, en donde la sustitución o inserción de histidina aumenta el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ en comparación con el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ antes de la sustitución o inserción de histidina, en donde dicho valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ se define como la relación de la actividad de unión al antígeno a pH 5,8 y la actividad de unión al antígeno a pH 7,4 y en donde dicha sustitución o inserción de histidina

- (a) prolonga la semivida en plasma o el periodo de retención en plasma promedio de dicho anticuerpo; o
- (b) aumenta la cantidad de veces de unión al antígeno para dicho anticuerpo, lo que se corresponde con un aumento de la cantidad de ciclos en que dicho anticuerpo unido por un antígeno se internaliza en una célula y se libera en forma libre de antígeno hacia el exterior de la célula;

5 Medios para resolver los problemas

En la presente se realizaron estudios especializados sobre métodos para la unión de polipéptidos con capacidad de unión al antígeno, como las moléculas de unión al antígeno, a los antígenos varias veces, y métodos para mejorar las semividas de dichas moléculas en el plasma (sangre) (mejorar su farmacocinética). Como resultado, se descubrió que si la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a pH endosómico temprano es inferior a su actividad de unión al antígeno a pH del plasma (sangre), podría unirse a los antígenos varias veces y tener una semivida en plasma más prolongada.

Por consiguiente, la presente descripción se refiere a métodos para la unión de las moléculas de unión al antígeno a los antígenos varias veces, métodos para mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno, y métodos para producir moléculas de unión al antígeno con mejor farmacocinética; la presente descripción también se refiere a moléculas de unión al antígeno que pueden unirse a los antígenos varias veces y moléculas de unión al antígeno con mejor farmacocinética. Más específicamente, la presente descripción proporciona:

- [1] una molécula de unión al antígeno con un valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$, definido como la relación de KD para el antígeno a pH 5,8 y KD para el antígeno a pH 7,4, de 2 o superior;
- [2] la molécula de unión al antígeno de [1], en donde el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ es 10 o superior;
- [3] la molécula de unión al antígeno de [1], en donde el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ es 40 o superior;
- [4] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de [1] a [3], en donde al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno se ha sustituido con histidina, o al menos una histidina se ha insertado en la molécula de unión al antígeno;
- [5] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de [1] a [4], en donde la molécula de unión al antígeno presenta actividad antagonista;
- [6] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de [1] a [5], en donde la molécula de unión al antígeno se une a un antígeno membrana o un antígeno soluble;
- [7] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de [1] a [6], en donde la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo;
- [8] una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión al antígeno de cualquiera de [1] a [7];
- [9] un método para mejorar la farmacocinética de una molécula de unión al antígeno al afectar la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 5,8 en comparación con la actividad a pH 7,4;
- [10] un método para aumentar la cantidad de veces de unión al antígeno para una molécula de unión al antígeno al afectar la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 5,8 en comparación con la actividad a pH 7,4;
- [11] un método para aumentar la cantidad de antígenos que pueden unirse con una molécula de unión al antígeno al afectar la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 5,8 en comparación con la actividad a pH 7,4;
- [12] un método para disociar dentro de una célula un antígeno de una molécula de unión al antígeno unida de manera extracelular al afectar la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 5,8 en comparación con la actividad a pH 7,4;
- [13] un método para liberar una molécula de unión al antígeno, que se ha unido a un antígeno e internalizado en una célula, de forma libre de antígeno al exterior de la célula al afectar la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 5,8 en comparación con la actividad a pH 7,4;
- [14] un método para aumentar la capacidad de una molécula de unión al antígeno para eliminar un antígeno en plasma al afectar la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 5,8 en comparación con la actividad a pH 7,4;

- [15] el método de cualquiera de [9] a [14], en donde el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$, definido como la relación de KD para el antígeno a pH 5,8 y KD para el antígeno a pH 7,4, es 2 o superior;
- [16] el método de cualquiera de [9] a [14], en donde el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ es 10 o superior;
- [17] el método de cualquiera de [9] a [14], en donde el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ es 40 o superior;
- 5 [18] un método para mejorar la farmacocinética de una molécula de unión al antígeno al sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno con histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno;
- [19] un método para aumentar la cantidad de veces de unión al antígeno para una molécula de unión al antígeno al sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno con histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno;
- 10 [20] un método para aumentar la cantidad de antígenos que pueden unirse con una molécula de unión al antígeno al sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno con histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno;
- [21] un método para disociar dentro de una célula un antígeno de una molécula de unión al antígeno unida de manera extracelular al sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno con histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno;
- 15 [22] un método para liberar una molécula de unión al antígeno, que se ha unido a un antígeno e internalizado en una célula, de forma libre de antígeno al exterior de la célula, al sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno con histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno;
- [23] un método para aumentar la capacidad de una molécula de unión al antígeno de eliminar un antígeno en plasma al sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno con histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno;
- 20 [24] el método de cualquiera de [18] a [23], en donde la sustitución o inserción de histidina aumenta el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$, definido como la relación de la actividad de unión al antígeno a pH 5,8 y la actividad de unión al antígeno a pH 7,4, en comparación con el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ antes de la sustitución o inserción de histidina;
- 25 [25] el método de cualquiera de [9] a [24], en donde la molécula de unión al antígeno presenta actividad antagonista;
- [26] el método de cualquiera de [9] a [25], en donde la molécula de unión al antígeno se une a un antígeno membrana o un antígeno soluble;
- 30 [27] el método de cualquiera de [9] a [26], en donde la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo;
- [28] un método para el análisis de una molécula de unión al antígeno, que comprende las etapas de:
- (a) determinar la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0;
- (b) determinar la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 4,0 a pH 6,5; y
- 35 (c) seleccionar una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0 sea superior a la actividad de unión al antígeno a pH 4,0 a pH 6,5;
- [29] el método de selección de [28], que comprende la etapa de seleccionar un anticuerpo cuya actividad de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0 sea del doble o más que la actividad de unión al antígeno a pH 4,0 a pH 6,5;
- [30] un método para el análisis de una molécula de unión al antígeno, que comprende las etapas de:
- 40 (a) unir una molécula de unión al antígeno a un antígeno a pH 6,7 a pH 10,0;
- 4.0 colocar la molécula de unión al antígeno que se unió al antígeno de (a) a pH 4,0 a pH 6,5; y
- (b) obtener una molécula de unión al antígeno que se disoció a pH 4,0 a pH 6,5;
- [31] un método para analizar una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH es superior que la actividad a un segundo pH, que comprende las etapas de:

- (a) unir una molécula de unión al antígeno a una columna inmovilizada con antígeno a un primer pH;
 - (b) eluir la molécula de unión al antígeno que se ha unido a la columna al primer pH de la columna a un segundo pH; y
 - (c) recoger la molécula de unión al antígeno eluida;
- 5 [32] un método para analizar una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH es superior que la actividad a un segundo pH, que comprende las etapas de:
- (a) unir una genoteca de molécula de unión al antígeno a una columna inmovilizada con antígeno a un primer pH;
 - (b) eluir la molécula de unión al antígeno de la columna a un segundo pH;
- 10 (c) amplificar el gen que codifica la molécula de unión al antígeno eluida; y
- (d) obtener la molécula de unión al antígeno eluida.
- [33] el método de selección de [31] o [32], en donde el primer pH es 6,7 a 10,0 y el segundo pH es 4,0 a 6,5;
- [34] el método de selección de cualquiera de [28] a [33], en donde al menos uno o más aminoácidos de la molécula de unión al antígeno se ha sustituido con histidina, o al menos una histidina se ha insertado en la molécula de unión al antígeno;
- 15 [35] el método de selección de cualquiera de [28] a [33], para obtener una molécula de unión al antígeno que es superior en retención en el plasma;
- [36] el método de selección de cualquiera de [28] a [33], para obtener una molécula de unión al antígeno que puede unirse a un antígeno dos o más veces;
- 20 [37] el método de selección de cualquiera de [28] a [33], para obtener una molécula de unión al antígeno que puede unirse a más antígenos en comparación con la cantidad de sus sitios de unión al antígeno;
- [38] el método de selección de cualquiera de [28] a [33], para obtener una molécula de unión al antígeno que disocia un antígeno unido de manera extracelular dentro de una célula;
- 25 [39] el método de selección de cualquiera de [28] a [33], para obtener una molécula de unión al antígeno que se une a un antígeno e internaliza en una célula, y se libera al exterior de la célula de forma libre de antígeno;
- [40] el método de selección de cualquiera de [28] a [33], para obtener una molécula de unión al antígeno que presenta una mayor capacidad para eliminar un antígeno en plasma;
- [41] el método de selección de cualquiera de [28] a [40], en donde la molécula de unión al antígeno se utiliza como una composición farmacéutica;
- 30 [42] el método de selección de cualquiera de [28] a [41], en donde la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo;
- [43] un método para producir una molécula de unión al antígeno, que comprende las etapas de:
- (a) determinar la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0;
 - (b) determinar la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 4,0 a pH 6,5;
- 35 (c) seleccionar la molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0 es superior a la de pH 4,0 a pH 6,5;
- (d) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno que se selecciona en (c); y
 - (e) producir la molécula de unión al antígeno usando el gen obtenido en (d);
- [44] un método para producir una molécula de unión al antígeno, que comprende las etapas de:
- 40 (a) unir una molécula de unión al antígeno a un antígeno a pH 6,7 a pH 10,0;

- (b) permitir que la molécula de unión al antígeno unida al antígeno de (a) permanezca a pH 4,0 a pH 6,5;
 - (c) recoger la molécula de unión al antígeno que se disoció a pH 4,0 a pH 6,5;
 - (d) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno obtenida en (c); y
 - (e) producir la molécula de unión al antígeno usando el gen obtenido en (d);
- 5 [45] un método para producir una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH es superior que la actividad a un segundo pH, que comprende las etapas de:
- (a) unir una molécula de unión al antígeno a una columna inmovilizada con antígeno a un primer pH;
 - (b) eluir la molécula de unión al antígeno que se encuentra unida a la columna al primer pH de la columna a un segundo pH;
- 10 (c) recoger la molécula de unión al antígeno eluida;
- (d) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno obtenida en (c); y
 - (e) producir la molécula de unión al antígeno usando el gen obtenido en (d);
- [46] un método para producir una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH es superior que la actividad a un segundo pH, que comprende las etapas de:
- 15 (a) unir una genoteca de molécula de unión al antígeno a una columna inmovilizada con antígeno a un primer pH;
- (b) eluir la molécula de unión al antígeno de la columna a un segundo pH;
 - (c) amplificar el gen que codifica la molécula de unión al antígeno eluida;
 - (d) recoger la molécula de unión al antígeno eluida;
- 20 (e) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno recogida en (d); y
- (f) producir la molécula de unión al antígeno usando el gen obtenido en (e);
- [47] el método de producción de [45] o [46], en donde el primer pH es 6,7 a 10,0 y el segundo pH es 4,0 a 6,5.
- [48] el método de producción de cualquiera de [43] a [47], que comprende además la etapa de sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno con histidina, o insertar al menos una histidina en la
- 25 molécula de unión al antígeno;
- [49] el método de producción de cualquiera de [43] a [48], en donde la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo;
- [50] una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión al antígeno producida mediante el método de producción de cualquiera de [43] a [49].

30 Efectos de la invención

La presente invención proporciona métodos para producir moléculas de unión al antígeno simples para que se unan de forma reiterada a varias moléculas de antígeno. Cuando una molécula de unión al antígeno se une a varias moléculas de antígeno, la farmacocinética de la molécula de unión al antígeno puede mejorar y dicha molécula puede producir efectos *in vivo* más superiores que los de las moléculas de unión al antígeno comunes.

35 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es un diagrama que ilustra una vía de degradación de anticuerpos unidos al antígeno unido a la membrana.

La Figura 2 es un diagrama que ilustra un mecanismo mediante el cual las moléculas de IgG son rescatadas por FcRn.

40 La Figura 3 es un diagrama esquemático que ilustra la re-unión de las moléculas de IgG a un nuevo antígeno luego

de la disociación del antígeno unido a la membrana dentro de los endosomas.

La Figura 4 es un diagrama esquemático que ilustra la re-unión de las moléculas de IgG a un nuevo antígeno luego de la disociación del antígeno soluble dentro de los endosomas.

La Figura 5 es un diagrama que ilustra el proceso de cribado con una columna inmovilizada con antígeno.

- 5 La Figura 6 presenta gráficas que ilustran los resultados de ELISA de fagos para clones adquiridos por cribado de columna. La gráfica superior ilustra el WT y la gráfica inferior ilustra CL5.

La Figura 7 es una gráfica que ilustra la actividad de neutralización biológica de los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH.

- 10 La Figura 8 presenta gráficas que ilustran los resultados del sensograma Biacore para la unión de los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH al receptor de IL-6 soluble a pH 7,4. La gráfica superior ilustra el WT; la segunda gráfica desde la parte superior ilustra H3pl/L73; la tercera gráfica desde la parte superior ilustra H170/L82; y la gráfica inferior ilustra CLH5/L73.

- 15 La Figura 9 presenta gráficas que ilustran los resultados del sensograma Biacore para la unión de los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH al receptor de IL-6 soluble a pH 5,8. La gráfica superior ilustra el WT; la segunda gráfica desde la parte superior ilustra H3pl/L73; la tercera gráfica desde la parte superior ilustra H170/L82; y la gráfica inferior ilustra CLH5/L73.

- 20 La Figura 10 presenta gráficas que ilustran resultados de sensograma Biacore para asociación (pH 7,4) y disociación (pH 5,8) de anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH al receptor de IL-6 tipo membrana. La gráfica superior ilustra el WT; la segunda gráfica desde la parte superior ilustra H3pl/L73; la tercera gráfica desde la parte superior ilustra H170/L82; y la gráfica inferior ilustra CLH5/L73.

La Figura 11 es un sensograma Biacore que indica la unión reiterada de anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH a SR344.

La Figura 12 es una gráfica que ilustra la cantidad total de antígeno unido en un experimento de unión reiterada de anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH a SR344.

- 25 La Figura 13 es una gráfica que ilustra los periodos de tiempo de las concentraciones de anticuerpo en plasma de los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH en ratones transgénicos del receptor de IL-6 humano.

La Figura 14 es una gráfica que ilustra los periodos de tiempo de las concentraciones de anticuerpo en plasma de los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH en monos cynomolgus.

- 30 La Figura 15 es una gráfica que ilustra los periodos de tiempo de las concentraciones de CRP en monos cynomolgus con relación a los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH.

La Figura 16 es una gráfica que ilustra los periodos de tiempo de las concentraciones del receptor de IL-6 de monos cynomolgus de tipo no unido en monos cynomolgus con relación a los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH.

- 35 La Figura 17 presenta gráficas que ilustran resultados de sensograma Biacore de asociación (pH 7,4) y disociación (pH 5,8) de anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH al receptor de IL-6 tipo membrana. En orden en sentido descendente, se muestran los resultados de WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1.

- 40 La Figura 18 es una gráfica que ilustra los periodos de tiempo de las concentraciones de anticuerpo en plasma de los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH (WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1) en ratones transgénicos del receptor de IL-6 humano.

La Figura 19 presenta gráficas que ilustran resultados de sensograma Biacore para asociación (pH 7,4) y disociación (pH 5,8) de anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH al receptor de IL-6 tipo membrana. En sentido descendente, se muestran los resultados de WT, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2 y Fv4-M58.

- 45 La Figura 20 es una gráfica que ilustra los periodos de tiempo de las concentraciones de anticuerpo en plasma de los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH (WT, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2 y Fv4-M58) en ratones transgénicos del receptor de IL-6 humano.

La Figura 21 presenta gráficas que ilustran resultados de sensograma Biacore de asociación (pH 7,4) y disociación (pH 5,8) de anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH al receptor de IL-6 tipo membrana. En sentido descendente, se muestran los resultados de Fv 1-M71, Fv 1-M73, Fv3-M71 y Fv3-M73.

- 50 La Figura 22 es una gráfica que ilustra los periodos de tiempo de las concentraciones de anticuerpo en plasma de

los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH en monos cynomolgus durante la administración de H3pl/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73 y Fv4-M73 a 0,5 mg/kg y durante la administración de Ab de alta afinidad a 1,0 mg/kg.

5 La Figura 23 es una gráfica que ilustra los periodos de tiempo de las concentraciones de CRP en monos cynomolgus con relación a los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH (grupos a los que se les administró H3pl/L73-IgG1-, Fv1-M71-, Fv1-M73-, Fv2-IgG1-, Fv3-M73-, Fv4-M73- y Ab de alta afinidad).

10 La Figura 24 es una gráfica que ilustra los periodos de tiempo de las concentraciones del receptor de IL-6 de monos cynomolgus de tipo no unido en monos cynomolgus con relación a los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH (grupos a los que se les administró H3pl/L73-IgG1-, Fv1-M71-, Fv1-M73-, Fv2-IgG1-, Fv3-M73-, Fv4-M73- y Ab de alta afinidad).

La Figura 25 es un diagrama que ilustra FR1, FR2, FR3 y FR4 junto con CDR1, CDR2 y CDR3 de cadenas pesadas (VH1, VH2, VH3, VH4) y cadenas ligeras (VL1, VL2, VL3). Los asteriscos indican las ubicaciones en las que existen mutaciones de aminoácidos en las secuencias alineadas.

15 La Figura 26 presenta un sensograma Biacore que ilustra la unión dependiente de pH de un anticuerpo anti-IL-6, anti-IL6 clon 2, a IL-6 a pH 7,4 y pH 5,5. Las curvas en el sensograma a pH 7,4 corresponden a 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 ng/mL de IL-6, precedente.

La Figura 27 presenta un sensograma Biacore que ilustra la unión dependiente de pH de un anticuerpo del receptor de anti-IL-31, anti-IL31R clon 1 al receptor de IL-31 a pH 7,4 y pH 5,5. Las curvas en el sensograma a pH 5,5 corresponden a 100, 50, 25 y 12,5 ng/mL del receptor de IL-31, precedente.

20 La Figura 28 ilustra el periodo de tiempo de concentración de anticuerpo en plasma después de la administración intravenosa de una mezcla de solución que contiene SR344 y un anticuerpo del receptor de IL-6 anti-humano al ratón.

25 La Figura 29 ilustra el periodo de tiempo de concentración de SR344 en plasma después de la administración intravenosa de una mezcla de solución que contiene SR344 y un anticuerpo del receptor de IL-6 anti-humano al ratón.

Modo de poner en práctica la descripción

30 La presente descripción proporciona métodos para aumentar la cantidad de veces de unión al antígeno en moléculas de unión al antígeno. Más específicamente, la presente descripción proporciona métodos para aumentar la cantidad de veces de unión al antígeno en moléculas de unión al antígeno al afectar la capacidad de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno a pH ácido en comparación con la capacidad a pH neutro. Además, la presente descripción proporciona métodos para aumentar la cantidad de veces de unión al antígeno en moléculas de unión al antígeno al sustituir al menos un aminoácido en las moléculas de unión al antígeno con histidina, o insertar al menos una histidina en las moléculas de unión al antígeno. Además, la presente descripción proporciona métodos para aumentar la cantidad de veces de unión al antígeno en moléculas de unión al antígeno al sustituir, eliminar, agregar y/o insertar aminoácidos en la región constante del anticuerpo de las moléculas de unión al antígeno.

35 La presente descripción también proporciona métodos para aumentar la cantidad de antígenos que pueden unirse con una molécula de unión al antígeno. Más específicamente, la presente descripción proporciona métodos para aumentar la cantidad de antígenos que pueden unirse con una molécula de unión al antígeno al afectar la capacidad de unión al antígeno a pH ácido en comparación con la capacidad a pH neutro. Además, la presente descripción proporciona métodos para aumentar la cantidad de antígenos que pueden unirse con una molécula de unión al antígeno al sustituir a menos un aminoácido en las moléculas de unión al antígeno con histidina o al insertar al menos una histidina en las moléculas de unión al antígeno. Además, la presente descripción proporciona métodos para aumentar la cantidad de antígenos que se pueden unir con una molécula de unión al antígeno al sustituir, eliminar, agregar y/o insertar aminoácidos en la región constante del anticuerpo de las moléculas de unión al antígeno.

40 La presente descripción también proporciona métodos para disociar dentro de una célula un antígeno de una molécula de unión al antígeno unida de forma extracelular. Más específicamente, la presente descripción proporciona métodos para disociar dentro de una célula un antígeno de una molécula de unión al antígeno unida de forma extracelular al afectar la capacidad de unión al antígeno a pH ácido en comparación con la capacidad a pH neutro. Además, la presente descripción proporciona métodos para disociar dentro de una célula un antígeno de una molécula de unión al antígeno unida de forma extracelular al sustituir al menos un aminoácido en la molécula de unión al antígeno con histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno. Además, la presente descripción proporciona métodos para disociar dentro de una célula un antígeno de una molécula de unión al antígeno unida de forma extracelular al sustituir, eliminar, agregar y/o insertar aminoácidos en la región constante del anticuerpo de la molécula de unión al antígeno.

La presente descripción también proporciona métodos para liberar una molécula de unión al antígeno, que se ha unido a un antígeno e internalizado en una célula, de forma libre de antígeno al exterior de la célula. Más específicamente, la presente descripción proporciona métodos para liberar una molécula de unión al antígeno, que se ha unido a un antígeno e internalizado en una célula, de forma libre de antígeno al exterior de la célula, al afectar la capacidad de unión al antígeno a pH ácido en comparación con la capacidad a pH neutro. Además, la presente descripción proporciona métodos para liberar una molécula de unión al antígeno, que se ha unido a un antígeno e internalizado en una célula, de forma libre de antígeno al exterior de la célula, al sustituir al menos un aminoácido en la molécula de unión al antígeno con histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno. Además, la presente descripción proporciona métodos para liberar una molécula de unión al antígeno, que se ha unido a un antígeno e internalizado en una célula, de forma libre de antígeno al exterior de la célula al sustituir, eliminar, agregar y/o insertar aminoácidos en la región constante del anticuerpo de la molécula de unión al antígeno.

La presente descripción también proporciona métodos para aumentar la capacidad de una molécula de unión al antígeno para eliminar los antígenos en plasma. Más específicamente, la presente descripción proporciona métodos para aumentar la capacidad de una molécula de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma al afectar la capacidad de unión al antígeno a pH ácido en comparación con la capacidad a pH neutro. Además, la presente descripción proporciona métodos para aumentar la capacidad de una molécula de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma al sustituir al menos un aminoácido en las moléculas de unión al antígeno con histidina, o insertar al menos una histidina en las moléculas de unión al antígeno. Además, la presente descripción proporciona métodos para aumentar la capacidad de una molécula de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma al sustituir, eliminar, agregar y/o insertar aminoácidos en la región constante del anticuerpo de la molécula de unión al antígeno.

La presente descripción también proporciona métodos para mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno. Más específicamente, la presente descripción proporciona métodos para mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno (prolongando la retención en plasma) al afectar la capacidad de unión al antígeno a pH ácido en comparación con la capacidad a pH neutro. Además, la presente descripción proporciona métodos para mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno al sustituir al menos un aminoácido en las moléculas de unión al antígeno con histidina, o insertar al menos una histidina en las moléculas de unión al antígeno.

Además, la presente invención proporciona métodos para mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno al sustituir, eliminar, agregar y/o insertar aminoácidos en la región constante del anticuerpo de las moléculas de unión al antígeno.

Además, la presente descripción proporciona métodos para aumentar la capacidad de las moléculas de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma. Más específicamente, la presente descripción proporciona métodos para aumentar la capacidad de las moléculas de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma al afectar la capacidad de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno a pH ácido en comparación con la capacidad a pH neutro. Además, la presente descripción proporciona métodos para aumentar la capacidad de las moléculas de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma al sustituir al menos un aminoácido en las moléculas de unión al antígeno con histidina, o insertar al menos una histidina en las moléculas de unión al antígeno. Además, la presente descripción proporciona métodos para aumentar la capacidad de las moléculas de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma al sustituir, eliminar, agregar y/o insertar aminoácidos en la región constante del anticuerpo de las moléculas de unión al antígeno.

En la presente memoria, "mejora de la farmacocinética", "superior farmacocinética" son indistintos de "mejora de la retención en plasma (sangre)", "superior retención en plasma (sangre)", respectivamente, y estas frases son sinónimos.

En la presente, afectar la actividad de unión al antígeno a pH ácido en comparación con la actividad a pH neutro significa que la capacidad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a pH 4,0 a pH 6,5 se ve afectada en comparación con la capacidad a pH 6,7 a pH 10,0, preferiblemente que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a pH 5,5 a pH 6,5 se ve afectada en comparación con la actividad a pH 10,0 a pH 8,0, y más preferiblemente que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a pH 5,8 se ve afectada en comparación con la actividad a pH 7,4. Por consiguiente, en la presente descripción, pH ácido es comúnmente pH 4,0 a pH 6,5, preferiblemente pH 5,5 a pH 6,5, y más preferiblemente pH 5,8. De manera alternativa, en la presente descripción, pH neutro es comúnmente pH 6,7 a pH 10,0, preferiblemente pH 7,0 a pH 8,0, y más preferiblemente pH 7,4.

En la presente memoria, la frase "afectar la capacidad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a pH ácido en comparación con la capacidad a pH neutro" es indistinta de la frase "aumentar la capacidad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a pH neutro en comparación con la capacidad a pH ácido". En otros términos, en la presente descripción, se debería aumentar la diferencia en la capacidad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno entre pH ácido y neutro. Por ejemplo, se debería aumentar el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ como se describe más adelante. Se puede aumentar la diferencia en la capacidad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno entre pH ácido y neutro, por ejemplo, mediante cualquiera de ellos o

ambos, al afectar la capacidad de unión al antígeno a pH ácido y aumentar la capacidad de unión al antígeno a pH neutro.

5 Las condiciones distintas del pH para determinar la actividad de unión al antígeno las pueden seleccionar de forma apropiada los expertos en la técnica y las condiciones no se encuentran limitadas de forma particular. Se puede determinar la actividad de unión al antígeno, por ejemplo, en condiciones de amortiguador MES y 37 °C como se describe en los Ejemplos de la presente. Además, se puede determinar la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, con Biacore (GE Healthcare) o similares, como se describe en los Ejemplos de la presente.

10 Cuando el antígeno es un antígeno soluble, se puede evaluar la actividad de unión al antígeno soluble mediante la inyección del antígeno como un analito en un chip inmovilizado con la molécula de unión al antígeno. De manera alternativa, cuando el antígeno es un antígeno membrana, se puede evaluar la actividad de unión al antígeno membrana mediante la inyección de la molécula de unión al antígeno como un analito en un chip inmovilizado con el antígeno.

15 En la presente descripción, la diferencia en la actividad de unión al antígeno entre pH ácido y neutro no se encuentra limitada de forma particular mientras que la actividad de unión al antígeno a pH ácido sea inferior que la actividad a pH neutro. Sin embargo, el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$, que es una relación de constante de disociación (KD) contra un antígeno a pH 5,8 y la relación a pH 7,4, es preferiblemente 2 o superior, más preferiblemente 10 o superior, y aun más preferiblemente 40 o superior. El límite superior del valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ no se encuentra limitado de forma particular, y puede ser cualquier valor, por ejemplo, 400, 1.000 o 10.000, siempre que la molécula pueda producirse mediante las tecnologías de los expertos en la técnica. Cuando el antígeno es un antígeno soluble, la actividad de unión al antígeno se puede presentar en términos de la constante de disociación (KD). De manera alternativa, cuando el antígeno es un antígeno membrana, la actividad de unión al antígeno se puede presentar en términos de la constante de disociación evidente. La constante de disociación (KD) y la constante de disociación evidente (KD evidente) se pueden determinar mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, con Biacore (GE healthcare), gráfica Scatchard, o FACS.

De manera alternativa, es posible utilizar, por ejemplo, la k_d , una constante de velocidad de disociación, como indicador de la diferencia en la actividad de unión al antígeno entre pH ácido y neutro.

30 Cuando se utiliza la constante de velocidad de disociación (k_d) como indicador de la diferencia en la actividad de unión en lugar de la constante de disociación (KD), el valor de $k_d(pH5,8)/k_d(pH7,4)$, que es una relación de la constante de velocidad de disociación (k_d) contra un antígeno a pH 5,8 y la relación a pH 7,4, es preferiblemente 2 o superior, más preferiblemente 5 o superior, incluso más preferiblemente 10 o superior, y aun más preferiblemente 30 o superior. El límite superior de $k_d(pH5,8)/k_d(pH7,4)$ no se limita de forma particular, y puede ser cualquier valor, por ejemplo, 50, 100 o 200, siempre que la molécula pueda producirse mediante las tecnologías comunes para los expertos en la técnica.

35 Cuando el antígeno es un antígeno soluble, la actividad de unión al antígeno se puede presentar en términos de la constante de velocidad de disociación (k_d). De manera alternativa, cuando el antígeno es un antígeno membrana, la actividad de unión al antígeno se puede presentar en términos de la constante de velocidad de disociación evidente. La constante de velocidad de disociación (k_d) y la constante de velocidad de disociación evidente (k_d evidente) se pueden determinar mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, con Biacore (GE healthcare) o FACS.

En la presente descripción, cuando se determina la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a distintos pH, se prefiere que las condiciones de medición salvo el pH sean constantes.

45 Los métodos para afectar la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a pH 5,8 en comparación con la actividad a pH 7,4 (métodos para otorgar la capacidad de unión dependiente del pH) no se encuentran limitados de forma particular y puede ser cualquier método. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, métodos para afectar la actividad de unión al antígeno a pH 5,8 en comparación con la actividad a pH 7,4 al sustituir los aminoácidos en la molécula de unión al antígeno con histidina o insertar histidina en la molécula de unión al antígeno. Ya se sabe que al anticuerpo se le puede proporcionar actividad de unión al antígeno dependiente del pH mediante la sustitución de los aminoácidos en el anticuerpo con histidina (FEBS Letter, 309(1), 8588 (1992)). Dichos sitios de mutación (sustitución) o inserción de histidina no se encuentran limitados de forma particular, y cualquier sitio es aceptable siempre que la actividad de unión al antígeno a pH 5,8 sea inferior que la actividad a pH 7,4 (el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ aumenta) en comparación con el momento anterior a la mutación o inserción. Cuando la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo, dichos sitios incluyen, por ejemplo, sitios dentro de una región variable del anticuerpo. Los expertos en la técnica pueden determinar de manera apropiada la cantidad apropiada de sitios de mutación o inserción de histidina. Se puede sustituir o insertar histidina en un único sitio, o en dos o más sitios. También es posible introducir una mutación distinta de histidina (mutación con aminoácidos distintos de histidina) al mismo tiempo. Además, la mutación de histidina se puede introducir de manera simultánea con inserción de histidina. Es posible sustituir o insertar histidina de forma aleatoria con un método como barrido de histidina, que usa histidina en lugar de alanina en barrido de alanina conocido por los expertos en la técnica. De manera

alternativa, las moléculas de unión al antígeno cuya $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ aumenta en comparación con el momento anterior a la mutación se pueden seleccionar de una genoteca de moléculas de unión al antígeno con mutación o inserción de histidina aleatoria.

5 Cuando se sustituyen los aminoácidos de una molécula de unión al antígeno con histidina o se inserta histidina entre los aminoácidos de la molécula, se prefiere, si bien no se requiere, que la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 7,4 después de la sustitución o inserción de histidina sea comparable a la actividad a pH 7,4 antes de la sustitución o inserción de histidina. La "actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 7,4 después de la sustitución o inserción de histidina es comparable a la actividad a pH 7,4 antes de la sustitución o inserción de histidina" significa que incluso después de la sustitución o inserción de histidina, la molécula de unión al antígeno retiene el 10 % o más, preferiblemente el 50 % o más, más preferiblemente el 80 % o más, y aun más preferiblemente el 90 % o más de la actividad de unión al antígeno del momento anterior a la sustitución o inserción de histidina. Cuando la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno se ha afectado debido a la sustitución o inserción de histidina, se puede ajustar la actividad de unión al antígeno mediante la introducción de sustitución, eliminación, adición y/o inserción de uno o más aminoácidos en la molécula de unión al antígeno de manera que la actividad de unión al antígeno se vuelva comparable a la actividad antes de la sustitución o inserción de histidina. La presente descripción también incluye dichas moléculas de unión al antígeno con una actividad de unión comparable como resultado de la sustitución, eliminación, adición y/o inserción de uno o más aminoácidos después de la sustitución o inserción de histidina.

20 Los métodos alternativos para afectar la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a pH 5,8 en comparación con la actividad a pH 7,4 incluyen los métodos para sustituir los aminoácidos en una molécula de unión al antígeno con aminoácidos no naturales o insertar aminoácidos no naturales en los aminoácidos de una molécula de unión al antígeno. Se sabe que la pK_a se puede controlar de manera artificial usando aminoácidos no naturales (Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44,34; Chem Soc Rev. 2004 Sep 10;33(7):422-30; Amino Acids. 1999;16(3-4):345-79). Por lo tanto, en la presente descripción, se pueden usar aminoácidos no naturales en lugar de la histidina que se describió anteriormente. Dicha sustitución y/o inserción de aminoácidos no naturales se puede introducir de manera simultánea con la sustitución y/o inserción de histidina que se describió anteriormente. Se puede utilizar cualquier aminoácido no natural en la presente descripción. Es posible utilizar aminoácidos no naturales conocidos por los expertos en la técnica.

30 Además, cuando la molécula de unión al antígeno es una sustancia con una región constante del anticuerpo, los métodos alternativos para afectar la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 5,8 en comparación con la actividad a pH 7,4 incluyen métodos para modificar la región constante del anticuerpo contenida en la molécula de unión al antígeno. Dichos métodos para modificar la región constante del anticuerpo incluyen, por ejemplo, métodos para sustituir una región constante descrita en los Ejemplos de la presente.

35 Los métodos alternativos para modificar la región constante del anticuerpo incluyen, por ejemplo, métodos para evaluar varios isotipos de región constante (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) y seleccionar un isotipo que afecta la actividad de unión al antígeno a pH 5,8 (aumenta la velocidad de disociación a pH 5,8). De manera alternativa, los métodos incluyen los métodos para afectar la actividad de unión al antígeno a pH 5,8 (aumentando la velocidad de disociación a pH 5,8) al sustituir aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un isotipo de tipo silvestre (la secuencia de aminoácidos de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 de tipo silvestre). La secuencia de la región bisagra de una región constante del anticuerpo es considerablemente distinta entre los isotipos (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), y la diferencia en la secuencia de aminoácidos de la región bisagra tiene un gran impacto en la actividad de unión al antígeno. Por lo tanto, es posible seleccionar un isotipo apropiado para afectar la actividad de unión al antígeno a pH 5,8 (para aumentar la velocidad de disociación a pH 5,8) al tener en cuenta el tipo de antígeno o epítipo. Además, dado que la diferencia en la secuencia de aminoácidos de la región bisagra tiene una influencia significativa en la actividad de unión al antígeno, se considera que los sitios de sustitución de aminoácidos preferidos en la secuencia de aminoácidos de un isotipo de tipo silvestre se encuentran dentro de la región bisagra.

50 Cuando la actividad de unión al antígeno de la sustancia de unión al antígeno a pH 5,8 se debilita en comparación con la actividad a pH 7,4 (cuando aumenta el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$) mediante los métodos descritos anteriormente y similares, generalmente se prefiere que el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ sea el doble o más, más preferiblemente cinco veces o más, y aun más preferiblemente diez veces o más en comparación con el del anticuerpo original, si bien la invención no se limita de manera particular a esto.

55 En la presente, la "mejora de la farmacocinética" significa la prolongación del tiempo requerido para la eliminación de la molécula de unión al antígeno del plasma (por ejemplo, alcanzar el estado en que la molécula de unión al antígeno no puede regresar al plasma debido a la degradación en las células, u otras razones) después de la administración a un animal como humano, ratón, rata, mono, conejo o perro, así como la prolongación del tiempo de retención en plasma de la molécula de unión al antígeno en una forma que pueda unirse a antígenos (por ejemplo, en forma libre de antígeno) durante el periodo hasta que se elimina del plasma después de la administración. Incluso si una molécula de unión al antígeno se hace circular en plasma, no puede unirse a un antígeno cuando ya se une a otro antígeno. Por consiguiente, se prolonga el periodo en el que la molécula de unión al antígeno se puede unir a otro antígeno (aumenta la posibilidad de unirse a otro antígeno) al prolongar el periodo en el que la molécula de unión al antígeno se encuentra en forma libre de antígeno. Esto hace posible acortar el periodo en el que el antígeno

- se encuentra libre de moléculas de unión al antígeno *in vivo* (dicho de otro modo, para prolongar el periodo en el que el antígeno se une con una molécula de unión al antígeno). Por ejemplo, la relación de antígenos unidos a moléculas de unión al antígeno contra los antígenos en el cuerpo en plasma (total de moléculas de antígeno unidas a y libres de las moléculas de unión al antígeno) generalmente disminuye en un periodo de tiempo determinado después de la administración de las moléculas de unión al antígeno. Sin embargo, dicha disminución se puede suprimir (por ejemplo, el grado de disminución puede ser menor) al prolongar el tiempo de retención de las moléculas de unión al antígeno de forma capaz de unirse a los antígenos. Esto genera un aumento de la relación de antígenos unidos a las moléculas de unión al antígeno contra los antígenos en el cuerpo en determinado periodo de tiempo después de la administración del anticuerpo.
- 5 De manera específica, en la presente descripción, la "mejora de la farmacocinética" no necesariamente significa la prolongación (extensión) del tiempo requerido para la eliminación de la molécula de unión al antígeno después de la administración. Incluso si el tiempo requerido para la eliminación de la molécula de unión al antígeno después de la administración permanece incambiado, se puede decir que la farmacocinética "mejora" en la presente invención si se prolonga el tiempo de retención en plasma de la molécula de unión al antígeno en forma que pueda unirse a un antígeno (por ejemplo, la molécula de unión al antígeno en forma libre de antígeno);
- 10 se acorta el periodo en el que el antígeno se encuentra libre de una molécula de unión al antígeno en el cuerpo (dicho de otro modo, se prolonga el periodo en el que la molécula de unión al antígeno se une a un antígeno); y
- 15 aumenta la relación de antígenos unidos a moléculas de unión al antígeno contra los antígenos en el cuerpo. Por lo tanto, en la presente descripción, la "mejora de la farmacocinética" comprende al menos:
- 20 (1) la prolongación del tiempo requerido para la eliminación de la molécula de unión al antígeno del plasma después de la administración de la molécula de unión al antígeno;
- (2) la prolongación del tiempo de retención en plasma de la molécula de unión al antígeno en una forma que pueda unirse a un antígeno después de la administración de la molécula de unión al antígeno;
- 25 (3) el acortamiento del periodo en el que el antígeno se encuentra libre de una molécula de unión al antígeno en el cuerpo después de la administración de la molécula de unión al antígeno (la prolongación del periodo en el que la molécula de unión al antígeno se une a un antígeno en el cuerpo); y
- 30 (4) el aumento de la relación de antígenos unidos a moléculas de unión al antígeno al antígeno en el cuerpo.
- 35 Cuando el antígeno es un antígeno soluble presente en el plasma, incluso si la farmacocinética de la molécula de unión al antígeno (velocidad de eliminación del plasma) es equivalente, hay casos en los que se acelera la eliminación del antígeno unido a la molécula de unión al antígeno. La reducción de la farmacocinética del antígeno (la aceleración de la eliminación del plasma) genera la mejora relativa de la farmacocinética de la molécula de unión al antígeno y, por lo tanto, conlleva la prolongación del tiempo de la molécula de unión al antígeno presente en el plasma en una forma que pueda unirse a los antígenos. Por lo tanto, en una realización, la "mejora de la farmacocinética" de las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción incluye el aumento de la velocidad de eliminación de antígenos solubles del plasma después de la administración de las moléculas de unión al antígeno (la capacidad de la molécula de unión al antígeno de eliminar los antígenos del plasma).
- 40 En la presente descripción, cuando el antígeno es un antígeno membrana, si una única molécula de unión al antígeno se une a varios antígenos se puede evaluar mediante el análisis si mejora la farmacocinética de la molécula de unión al antígeno. Se puede evaluar si la "farmacocinética mejora" mediante el siguiente método. Por ejemplo, si se prolonga el tiempo requerido para la eliminación de una molécula de unión al antígeno después de la administración se puede evaluar al determinar cualquiera de los parámetros para la molécula de unión al antígeno, como la semivida en plasma, el tiempo de retención en plasma promedio, y la depuración en plasma ("Pharmacokinetics: Enshu-niyoru Rikai (Understanding through practice)" Nanzando). Por ejemplo, cuando se prolonga la semivida en plasma o el tiempo de retención en plasma promedio de una molécula de unión al antígeno administrada a ratones, ratas, monos, conejos, perros, humanos u otros animales, se considera que la farmacocinética de la molécula de unión al antígeno mejora.
- 45 Estos parámetros se pueden determinar mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los parámetros se pueden evaluar de manera apropiada mediante análisis no compartimental usando software de análisis farmacocinético WinNonlin (Pharsight) de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto.
- 50 De manera alternativa, si se prolonga el tiempo de retención en plasma de una molécula de unión al antígeno en una forma que pueda unirse a los antígenos después de la administración de la molécula de unión al antígeno se puede evaluar al medir la concentración en plasma de la molécula de unión al antígeno libre de antígeno y determinar cualquiera de los parámetros para la molécula de unión al antígeno libre de antígeno, como semivida en plasma, tiempo de retención en plasma promedio y depuración en plasma. La concentración de la molécula de unión al antígeno libre de antígeno en plasma se puede medir mediante los métodos conocidos por los expertos en la
- 55

técnica. Por ejemplo, dichas mediciones se describen en Clin Pharmacol. Abril 2008;48(4):406-17.

Además, si se acorta el periodo en el que un antígeno se encuentra libre de las moléculas de unión al antígeno en el cuerpo después de la administración de las moléculas de unión al antígeno (se prolonga el periodo en el que la molécula de unión al antígeno se une a un antígeno en el cuerpo) se puede evaluar al determinar la concentración en plasma del antígeno no unido que se encuentra libre de las moléculas de unión al antígeno, y considerar el periodo en el que la concentración de antígeno libre en plasma o la relación de cantidad de antígeno libre contra el antígeno total permanece baja. La concentración en plasma del antígeno libre o la relación de cantidad de antígeno libre contra el antígeno total se puede determinar mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, dichas mediciones se describen en Pharm Res. Enero 2006;23(1):95-103. De manera alternativa, cuando el antígeno cumple alguna función *in vivo*, se puede evaluar si el antígeno se une con una molécula de unión al antígeno que neutraliza la función del antígeno (molécula antagonista) al analizar si se neutraliza la función del antígeno. Se puede evaluar si se neutraliza la función del antígeno mediante el análisis de un marcador *in vivo* que refleja la función del antígeno. Se puede evaluar si el antígeno se une con una molécula de unión al antígeno que activa la función del antígeno (molécula agonista) mediante el análisis de un marcador *in vivo* que refleja la función del antígeno.

No existe una limitación particular de la determinación de la concentración en plasma de antígeno libre y la relación de cantidad de antígeno libre contra el antígeno total, y el ensayo marcador *in vivo*, pero la determinación se realiza preferiblemente después de determinado periodo luego de la administración de una sustancia de unión al antígeno. En la presente descripción, dicho periodo luego de la administración de una sustancia de unión al antígeno no se encuentra limitado de manera particular, y los expertos en la técnica pueden determinar un periodo apropiado según las propiedades de la sustancia de unión al antígeno administrada y similares. Los ejemplos del periodo son: un día después de la administración de una sustancia de unión al antígeno; tres días después de la administración de una sustancia de unión al antígeno, siete días después de la administración de una sustancia de unión al antígeno, 14 días después de la administración de una sustancia de unión al antígeno, y 28 días después de la administración de una sustancia de unión al antígeno.

En la presente descripción, se prefiere mejorar la farmacocinética en humanos.

Incluso cuando es difícil determinar la retención en plasma en humanos, se puede predecir en función de la retención en plasma en ratones (por ejemplo, ratones normales, ratones transgénicos que expresan antígeno humano, y ratones transgénicos que expresan FcRn humano) o monos (por ejemplo, monos cynomolgus).

Los métodos para determinar la retención en plasma no se encuentran limitados de manera particular. La determinación se puede llevar a cabo, por ejemplo, de acuerdo con los métodos que se describen en los Ejemplos de la presente.

Se puede evaluar si una molécula de unión al antígeno puede unirse a antígenos varias veces al analizar si el antígeno unido a una molécula de unión al antígeno en condiciones neutras ya que el plasma se disocia en condiciones ácidas iguales al endosoma y a cuántos antígenos se puede unir la molécula de unión al antígeno en las condiciones neutras. De manera específica, la evaluación se puede realizar permitiendo que la molécula de unión al antígeno y el antígeno formen un complejo en condiciones neutras, exponiendo el complejo a condiciones ácidas durante un periodo predeterminado, y luego analizando si la molécula de unión al antígeno puede volver a unirse a un antígeno en condiciones neutras, usando un dispositivo para analizar las reacciones entre la molécula de unión al antígeno y el antígeno, como Biacore. Cuando la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno que presenta la capacidad de unión dependiente del pH ha aumentado al doble de la capacidad de la molécula de unión al antígeno antes de la modificación, se puede considerar que la cantidad de veces de unión de la molécula de unión al antígeno que presenta la capacidad de unión dependiente del pH ha aumentado al doble de la capacidad de la molécula de unión al antígeno antes de la modificación. De manera alternativa, cuando el antígeno es un antígeno membrana y, por lo tanto, se elimina la molécula de unión al antígeno del plasma mediante absorción mediada por antígeno y degradación en un lisosoma, se puede evaluar si la cantidad de veces de unión de la molécula de unión al antígeno que presenta capacidad de unión dependiente del pH aumenta en comparación con la capacidad antes de la modificación al comparar la farmacocinética o duración de unión al antígeno entre la molécula de unión al antígeno que presenta capacidad de unión dependiente del pH y la molécula de unión al antígeno antes de la modificación. Por ejemplo, cuando la duración de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno que presenta la capacidad de unión dependiente del pH se prolonga al doble de la duración de la molécula de unión al antígeno antes de la modificación, se considera que la cantidad de veces de unión de la molécula de unión al antígeno que presenta la capacidad de unión dependiente del pH ha aumentado al doble de la capacidad de la molécula de unión al antígeno antes de la modificación. De manera alternativa, cuando se determina la concentración en plasma de un antígeno no unido, que se encuentra libre de la molécula de unión al antígeno, y el periodo en el que la concentración en plasma del antígeno libre o la relación de cantidad del antígeno libre contra el antígeno total permanece baja se prolonga al doble, se considera que la cantidad de veces de unión de la molécula de unión al antígeno que presenta la capacidad de unión dependiente del pH ha aumentado al doble de la capacidad de la molécula de unión al antígeno antes de la modificación.

Cuando el antígeno es un antígeno soluble, si el antígeno unido a una molécula de unión al antígeno en condiciones

neutras en plasma se disocia en un endosoma, y la molécula de unión al antígeno regresa al plasma, la molécula de unión al antígeno se puede unir nuevamente a un antígeno en condiciones neutras en plasma. Por lo tanto, una molécula de unión al antígeno que presenta las características para disociarse con un antígeno en condiciones ácidas de un endosoma puede unirse a los antígenos varias veces. En comparación con el momento en el que el antígeno unido a una molécula de unión al antígeno no se disocia en un endosoma (el antígeno permanece unido a la molécula de unión al antígeno cuando regresa al plasma), cuando el antígeno unido a una molécula de unión al antígeno se disocia en endosomas, el antígeno se libera a un lisosoma y luego se degrada y, por lo tanto, aumenta la velocidad de eliminación del antígeno del plasma. Es decir, también es posible determinar si la molécula de unión al antígeno puede unirse a los antígenos varias veces usando la velocidad de eliminación del antígeno del plasma como índice. Se puede determinar la velocidad de eliminación del antígeno del plasma, por ejemplo, mediante la administración de los antígenos (por ejemplo, antígeno membrana) y las moléculas de unión al antígeno *in vivo*, y luego la medición de la concentración de antígenos en plasma. Cuando se produce o secreta un antígeno (por ejemplo, antígeno membrana) *in vivo*, se reduce la concentración de antígeno en plasma si aumenta la velocidad de eliminación del antígeno del plasma. Por lo tanto, también es posible determinar si la molécula de unión al antígeno puede unirse a los antígenos varias veces usando la concentración del antígeno en plasma como índice.

En la presente memoria, "aumentar la cantidad de veces de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno" significa que la cantidad de ciclos aumenta al considerar como un ciclo el proceso en el que una molécula de unión al antígeno administrada a un humano, ratón, mono o similar se une a un antígeno e internaliza en una célula. De manera específica, en la presente memoria, "la molécula de unión al antígeno se une dos veces a un antígeno" significa que la molécula de unión al antígeno unida con un antígeno se internaliza en una célula y libera en forma libre de antígeno al exterior de la célula, y la molécula de unión al antígeno liberada se vuelve a unir a otro antígeno e internaliza en una célula nuevamente.

Cuando la molécula de unión al antígeno se internaliza en una célula se puede encontrar en una forma unida con un único antígeno, o dos o más antígenos.

En la presente memoria, "la cantidad de veces de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno aumenta" no significa necesariamente que la cantidad de veces de unión al antígeno aumenta en cada una de las moléculas de unión al antígeno. Por ejemplo, entre las moléculas de unión al antígeno en una composición de moléculas de unión al antígeno, la proporción de moléculas de unión al antígeno que se unen a los antígenos dos veces o más puede aumentar, o puede aumentar la cantidad promedio de eventos de unión de las moléculas de unión al antígeno en una composición de moléculas de unión al antígeno.

En la presente descripción, se prefiere que la cantidad de veces de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno aumente cuando la molécula se administra a un humano. Sin embargo, cuando es difícil determinar la cantidad de veces de unión al antígeno en humanos, se puede predecir la cantidad en humanos en función de los resultados obtenidos mediante ensayo o medición *in vitro* usando ratones (por ejemplo, ratones transgénicos que expresan antígeno y ratones transgénicos que expresan FcRn humano) o monos (por ejemplo, monos cynomolgus).

En la presente descripción, se prefiere que una molécula de unión al antígeno se una a los antígenos dos veces o más. Por ejemplo, se prefiere que, de las moléculas de unión al antígeno en una composición de moléculas de unión al antígeno, al menos el 10 % o más, preferiblemente el 30 % o más, más preferiblemente el 50 % o más, y aun más preferiblemente el 80 % o más (por ejemplo, 90 % o más, 95 % o más, etc.) se una a los antígenos dos veces o más.

En la presente memoria, "aumentar la cantidad de antígenos que se pueden unir con una molécula de unión al antígeno" significa aumentar la cantidad de antígenos que se pueden unir con una molécula de unión al antígeno durante el periodo hasta que se degrada la molécula de unión al antígeno en un lisosoma de una célula después de la administración de la molécula de unión al antígeno a un animal como un humano, ratón o mono.

En general, los anticuerpos como IgG tienen dos dominios de unión y, por lo tanto, un único anticuerpo se une a un máximo de dos antígenos. Un anticuerpo unido a uno o más antígenos se internaliza en una célula, y el anticuerpo y el o los antígenos se degrada en un lisosoma. En general, los anticuerpos como IgG pueden unirse a un máximo de dos antígenos. Cuando la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno como un anticuerpo a pH endosómico se ve afectada en comparación con la actividad a pH del plasma mediante los métodos de la presente invención, la molécula de unión al antígeno como un anticuerpo internalizado en una célula disocia el antígeno y se libera al exterior de la célula y, por lo tanto, puede unirse a otro antígeno nuevamente. Dicho de otro modo, los métodos de la presente descripción permiten que una molécula de unión al antígeno se una a más antígenos que la cantidad de sus sitios de unión al antígeno. De manera específica, al usar los métodos de la presente descripción, por ejemplo, IgG con dos sitios de unión al antígeno puede unirse a tres o más antígenos, preferiblemente cuatro o más antígenos, durante un periodo hasta que el anticuerpo se degrada después de la administración. Por ejemplo, cuando el anticuerpo es un anticuerpo de neutralización, "aumentar la cantidad de antígenos que se pueden unir con una molécula de unión al antígeno" es indistinto de "aumentar la cantidad de antígenos que puede neutralizar la molécula de unión al antígeno". Por lo tanto, "unir" se puede reemplazar con "neutralizar" cuando el anticuerpo es un anticuerpo de neutralización.

En la presente descripción "aumentar la cantidad de antígenos que se pueden unir con una molécula de unión al

antígeno" no significa necesariamente aumentar la cantidad de antígenos que se pueden unir con cada molécula de unión al antígeno. Por ejemplo, la cantidad promedio de antígenos que se pueden unir con una molécula de unión al antígeno en una composición de moléculas de unión al antígeno puede aumentar, o la proporción de moléculas de unión al antígeno que se pueden unir a más antígenos que la cantidad de sus sitios de unión al antígeno puede aumentar.

En la presente descripción, se prefiere que la cantidad de antígenos que se pueden unir a una molécula de unión al antígeno aumente cuando la molécula se administra a un humano.

Sin embargo, cuando es difícil determinar la cantidad en humanos, se puede predecir en función de los resultados obtenidos mediante ensayo o medición *in vitro* usando ratones (por ejemplo, ratones transgénicos que expresan antígeno y ratones transgénicos que expresan FcRn humano) o monos (por ejemplo, monos cynomolgus). Cuando el anticuerpo es un anticuerpo de neutralización, generalmente se supone que la cantidad de veces de unión al antígeno que se describió anteriormente de la molécula de unión al antígeno se correlaciona con la cantidad de antígenos que se pueden neutralizar con una molécula de unión al antígeno. Por lo tanto, la cantidad de antígenos que se pueden neutralizar con una molécula de unión al antígeno se puede determinar mediante los mismos métodos que se describieron anteriormente para determinar la cantidad de veces de unión de una molécula de unión al antígeno.

Además, la presente descripción proporciona métodos para unir una molécula de unión al antígeno a los antígenos dos veces o más en el cuerpo, mediante la administración de una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH ácido es inferior que la actividad a pH neutro.

La presente descripción también se refiere a métodos para neutralizar una mayor cantidad de antígenos que la cantidad de sitios de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno con la actividad de neutralización mediante la administración de la molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH ácido es inferior que la actividad a pH neutro. Preferiblemente, la presente descripción se refiere a métodos para neutralizar tres o más antígenos, preferiblemente cuatro o más antígenos mediante la administración de IgG cuya actividad de unión al antígeno a pH ácido es inferior que la actividad a pH neutro.

La presente descripción también se refiere a métodos para disociar dentro de una célula un antígeno de una molécula de unión al antígeno unida de manera extracelular al afectar la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH ácido en comparación con la capacidad a pH neutro. En la presente descripción, el antígeno se puede disociar de la molécula de unión al antígeno en cualquier parte dentro de una célula; sin embargo, se prefiere que el antígeno se disocie dentro de un endosoma temprano. En la presente invención, "un antígeno se disocia dentro de una célula de una molécula de unión al antígeno unida de manera extracelular" no significa necesariamente que cada antígeno internalizado en una célula mediante unión a la molécula de unión al antígeno se disocia de la molécula de unión al antígeno dentro de la célula. Es aceptable que la proporción de antígeno que se disocia de la molécula de unión al antígeno dentro de una célula aumente en comparación con el momento anterior a afectar la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH ácido en comparación con la capacidad a pH neutro.

Además, la presente descripción se refiere a métodos para aumentar la unión intracelular de una molécula de unión al antígeno libre de un antígeno a FcRn al afectar la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH ácido en comparación con la capacidad a pH neutro. En general, FcRn se une a una molécula de unión al antígeno dentro de un endosoma. Sin embargo, se supone que una molécula de unión al antígeno unida a un antígeno membrana no se une a FcRn. Por lo tanto, en una realización preferida, cuando el antígeno es un antígeno unido a la membrana, la presente descripción, incluye métodos para aumentar la disociación endosómica de antígenos de moléculas de unión al antígeno y, por lo tanto, aumentar la unión de FcRn de las moléculas de unión al antígeno, al afectar la capacidad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a pH endosómico (pH ácido) en comparación con la capacidad a pH de plasma (pH neutro). Cuando el antígeno es un antígeno soluble, la molécula de unión al antígeno se puede unir a FcRn en presencia o ausencia del antígeno. Si la disociación del antígeno de la molécula de unión al antígeno dentro de los endosomas se puede promover al afectar la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH intraendosómico (ácido) en comparación con la capacidad a pH de plasma (neutro), se puede aumentar la unión de FcRn de la molécula de unión al antígeno que se encuentra "libre de un antígeno" mediante los métodos de la presente invención.

Independientemente de si un antígeno se encuentra unido a la membrana o es soluble, si una molécula de unión al antígeno libre de un antígeno puede volver al plasma con FcRn, la molécula de unión al antígeno puede unirse al antígeno nuevamente. Al repetir este proceso, la molécula de unión al antígeno se puede unir al antígeno varias veces. En la presente descripción, "aumentar la unión de FcRn de una molécula de unión al antígeno dentro de una célula" no significa necesariamente que cada molécula de unión al antígeno se une a FcRn. Es aceptable que la proporción de una molécula de unión al antígeno que se encuentra libre de un antígeno que se une a FcRn dentro de una célula aumente en comparación con el momento anterior a afectar la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH endosómico en comparación con la capacidad a pH de plasma. Las moléculas de unión al antígeno preferidas en los métodos de la presente descripción para aumentar la unión intracelular entre la molécula de unión al antígeno e FcRn incluyen, por ejemplo, las moléculas de unión al antígeno que se unen a los

antígenos unidos a la membrana (antígenos de membrana) como las proteínas de membrana. Otras moléculas de unión al antígeno preferidas incluyen moléculas de unión al antígeno que se unen a antígenos solubles, como proteínas solubles.

5 Los métodos para aumentar la unión de una molécula de unión al antígeno y FcRn dentro de una célula se expresan de manera alternativa como los métodos para promover la unión de FcRn de una molécula de unión al antígeno dentro de una célula, por ejemplo, dentro de endosomas.

Además, la presente descripción se refiere a métodos para liberar una molécula de unión al antígeno, que se ha unido a un antígeno e internalizado en una célula, de forma libre de antígeno al exterior de la célula, al afectar la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH ácido en comparación con la capacidad a pH neutro. En la presente invención, "liberar una molécula de unión al antígeno", que se ha unido a un antígeno e internalizado en una célula, en forma libre de antígeno al exterior de la célula" no significa necesariamente que cada molécula de unión al antígeno, que se ha unido a un antígeno e internalizado en una célula, se libera en forma libre de antígeno al exterior de la célula. Es aceptable que la proporción de moléculas de unión al antígeno que se liberan al exterior de la célula aumente en comparación con el momento anterior a afectar la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH ácido en comparación con la capacidad a pH neutro. Se prefiere que la molécula de unión al antígeno liberada al exterior de una célula retenga la capacidad de unión al antígeno. Además, el método para liberar una molécula de unión al antígeno, que se ha unido a un antígeno e internalizado en una célula, en una forma libre de antígeno al exterior de la célula también se puede denominar como método para otorgar a la molécula de unión al antígeno una propiedad para que la molécula de unión al antígeno se libere más fácilmente al exterior de la célula en forma libre de antígeno cuando la molécula de unión al antígeno se une a un antígeno e internaliza en una célula.

Además, la presente descripción se refiere a métodos para aumentar la capacidad de las moléculas de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma al afectar la capacidad de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno a pH ácido en comparación con la capacidad a pH neutro. En la presente descripción, "la capacidad de eliminar antígenos en plasma" se refiere a la capacidad de eliminar del plasma los antígenos que se encuentran presentes en el plasma, cuando las moléculas de unión al antígeno se administran *in vivo* o se secretan *in vivo*. Por lo tanto, en la presente descripción, "aumentar la capacidad de la molécula de unión al antígeno de eliminar el antígeno en plasma" significa que se acelera la velocidad de eliminación de los antígenos del plasma cuando se administran las moléculas de unión al antígeno *in vivo* en comparación con la velocidad antes de disminuir la capacidad de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno a pH ácido en comparación con la capacidad a pH neutro. Se puede determinar si aumenta la capacidad de la molécula de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma, por ejemplo, al administrar antígenos solubles y moléculas de unión al antígeno *in vivo*, y luego medir la concentración de antígenos solubles en plasma. Cuando se reduce la concentración de antígenos solubles en plasma después de la administración de antígenos solubles y moléculas de unión al antígeno al disminuir la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH ácido con respecto a la capacidad a pH neutro, se puede determinar que aumenta la capacidad de la molécula de unión al antígeno de eliminar los antígenos en plasma.

La presente descripción también se refiere a métodos para mejorar la farmacocinética de una molécula de unión al antígeno al sustituir al menos un aminoácido en la molécula de unión al antígeno con histidina o un aminoácido no natural o insertar histidina o un aminoácido no natural en la molécula.

Además, la presente descripción proporciona métodos para aumentar la cantidad de veces de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno al sustituir al menos un aminoácido en la molécula de unión al antígeno con histidina o un aminoácido no natural o insertar histidina o un aminoácido no natural en la molécula.

Además, la presente descripción se refiere a métodos para aumentar la cantidad de antígenos que pueden unirse con una molécula de unión al antígeno al sustituir al menos un aminoácido en la molécula de unión al antígeno con histidina o un aminoácido no natural o insertar histidina o un aminoácido no natural en la molécula.

La presente descripción también proporciona métodos para disociar un antígeno dentro de una célula de una molécula de unión al antígeno unida de manera extracelular al sustituir al menos un aminoácido en la molécula de unión al antígeno con histidina o un aminoácido no natural o insertar histidina o un aminoácido no natural en la molécula.

La presente descripción también proporciona métodos para liberar una molécula de unión al antígeno, que se ha unido a un antígeno e internalizado en una célula, de forma libre de antígeno al exterior de la célula, al sustituir al menos un aminoácido en la molécula de unión al antígeno con histidina o un aminoácido no natural, o insertar histidina o un aminoácido no natural en la molécula.

55 La presente descripción también proporciona métodos para aumentar la capacidad de la molécula de unión al antígeno de eliminar los antígenos en plasma al sustituir al menos un aminoácido en la molécula de unión al antígeno con histidina o un aminoácido no natural o insertar histidina o un aminoácido no natural en la molécula.

El sitio de mutación (sustitución, inserción, etc.) de histidina o un aminoácido no natural no se encuentra limitado de

- manera particular. Se puede sustituir o insertar una histidina o un aminoácido no natural en cualquier sitio. Los sitios preferidos de sustitución o inserción de histidina o un aminoácido no natural incluyen, por ejemplo, sitios dentro de una región que tiene un impacto en la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno. Por ejemplo, cuando la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo, dichos sitios incluyen una región variable de anticuerpo o CDR. La cantidad de mutaciones de histidina o un aminoácido no natural no se encuentra limitada de manera particular. Se puede sustituir o insertar histidina o un aminoácido no natural en un único sitio, o en dos o más sitios. Además, de manera simultánea con la sustitución o inserción de histidina o un aminoácido no natural se puede introducir una eliminación, adición, inserción y/o sustitución de otros aminoácidos.
- 5
- En la presente descripción, cuando la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo, los posibles sitios de sustitución de histidina o un aminoácido no natural incluyen, por ejemplo, sitios dentro de la secuencia de CDR o la secuencia responsable de la estructura de CDR de un anticuerpo. Dichos sitios incluyen, por ejemplo, los sitios que se enumeran a continuación. Las posiciones de aminoácidos se enumeran en función de la numeración de Kabat (Kabat EA *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH).
- 10
- Cadena pesada: H27, H31, H32, H33, H35, H50, H58, H59, H61, H62, H63, H64, H65, H99, H100b y H102
- 15
- Cadena ligera: L24, L27, L28, L32, L53, L54, L56, L90, L92 y L94
- Entre los sitios que anteceden, H32, H61, L53, L90 y L94 podrían ser los sitios de modificación universales.
- Cuando el antígeno es el receptor de IL-6 (*por ejemplo*, receptor de IL-6 humano), los sitios de modificación preferibles incluyen los siguientes. Sin embargo, los sitios de modificación no se encuentran limitados de manera particular a estos.
- 20
- Cadena pesada: H27, H31, H32, H35, H50, H58, H61, H62, H63, H64, H65, H100b y H102
- Cadena ligera: L24, L27, L28, L32, L53, L56, L90, L92 y L94
- Cuando se sustituye histidina o un aminoácido no natural en varios sitios, las combinaciones preferidas de sitios de sustitución incluyen, por ejemplo, la combinación de H27, H31 y H35; la combinación de H27, H31, H32, H35, H58, H62 y H102; la combinación de L32 y L53; y la combinación de L28, L32 y L53. Además, las combinaciones preferidas de sitios de sustitución de cadenas pesadas y ligeras incluyen la combinación de H27, H31, L32 y L53.
- 25
- Cuando el antígeno es IL-6 (*por ejemplo*, IL-6 humano), los sitios de modificación preferibles incluyen los siguientes. Sin embargo, los sitios de modificación no se encuentran limitados de manera particular a estos.
- Cadena pesada: H32, H59, H61 y H99
- Cadena ligera: L53, L54, L90 y L94
- 30
- Cuando el antígeno es el receptor de IL-31 (*por ejemplo*, receptor de IL-31 humano), los sitios de modificación preferibles incluyen H33. Sin embargo, los sitios de modificación no se encuentran limitados de manera particular a estos.
- Con respecto a los sitios que anteceden, se puede sustituir solamente un sitio con histidina o un aminoácido no natural. De manera alternativa, se pueden sustituir varios sitios con histidina o un aminoácido no natural.
- 35
- Los métodos de la presente descripción son aplicables a cualquier molécula de unión al antígeno, independientemente del tipo de antígeno diana.
- Las moléculas de unión al antígeno que se describen en la presente no se encuentran limitadas de manera particular en la medida en que tengan la actividad de unión específica en un antígeno de interés. Las moléculas de unión al antígeno preferidas incluyen, por ejemplo, sustancias con un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo. El dominio de unión al antígeno de un anticuerpo incluye, por ejemplo, CDR y región variable. Cuando el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo es CDR, la molécula de unión al antígeno puede incluir las seis CDR de un anticuerpo entero, o una, o dos o más de estas. De manera alternativa, cuando la molécula de unión al antígeno incluye CDR como dominio de unión de un anticuerpo, la CDR puede incluir eliminación, sustitución, adición y/o inserción de aminoácido, o puede ser una CDR parcial.
- 40
- 45
- Además, cuando la molécula de unión al antígeno incluye una región constante de anticuerpo, la presente descripción se refiere a métodos para mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno mediante la modificación (por ejemplo, sustitución, eliminación, adición y/o inserción de aminoácidos) de la región constante del anticuerpo en la molécula de unión al antígeno.
- 50
- Además, cuando la molécula de unión al antígeno incluye una región constante de anticuerpo, la presente descripción proporciona métodos para aumentar la cantidad de veces de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno mediante la modificación (por ejemplo, sustitución, eliminación, adición y/o inserción de aminoácidos) de la región constante del anticuerpo en la molécula de unión al antígeno.

Además, cuando la molécula de unión al antígeno incluye una región constante de anticuerpo, la presente descripción se refiere a métodos para aumentar la cantidad de antígenos que pueden unirse con una molécula de unión al antígeno mediante la modificación (por ejemplo, sustitución, eliminación, adición y/o inserción de aminoácidos) de la región constante del anticuerpo en la molécula de unión al antígeno.

- 5 Además, cuando la molécula de unión al antígeno incluye una región constante de anticuerpo, la presente descripción se refiere a métodos para disociar dentro de una célula un antígeno de una molécula de unión al antígeno unida de manera extracelular mediante la modificación (por ejemplo, sustitución, eliminación, adición y/o inserción de aminoácidos) de la región constante del anticuerpo en la molécula de unión al antígeno.

- 10 Además, cuando la molécula de unión al antígeno incluye una región constante de anticuerpo, la presente descripción se refiere a métodos para liberar una molécula de unión al antígeno, que se ha unido a un antígeno e internalizado en una célula, de forma libre de antígeno al exterior de la célula, mediante la modificación (por ejemplo, sustitución, eliminación, adición y/o inserción de aminoácidos) de la región constante del anticuerpo en la molécula de unión al antígeno.

- 15 Además, cuando la molécula de unión al antígeno incluye una región constante de anticuerpo, la presente descripción se refiere a métodos para aumentar la capacidad de una molécula de unión al antígeno de eliminar los antígenos en plasma mediante la modificación (por ejemplo, sustitución, eliminación, adición y/o inserción de aminoácidos) de la región constante del anticuerpo en la molécula de unión al antígeno.

- 20 En una realización preferida, la sustancia de unión al antígeno de la presente invención incluye las sustancias de unión al antígeno que incluyen una región de unión a FcRn. Después de que se internalizan en las células, las sustancias de unión al antígeno que incluyen una región de unión a FcRn pueden volver al plasma mediante la vía de rescate de FcRn. La región de unión a FcRn es preferiblemente un dominio que se une directamente a FcRn. La región de unión a FcRn preferida incluye, por ejemplo, regiones de Fc de anticuerpo.

- 25 Sin embargo, la región de unión a FcRn de la presente invención puede ser una región que se puede unir a un polipéptido con la capacidad de unirse a FcRn, como albúmina o IgG, dado que dicha región que se puede unir al polipéptido con la capacidad de unión a FcRn se puede unir indirectamente a FcRn mediante albúmina, IgG, etc.

- 30 Los antígenos reconocidos por las moléculas de unión al antígeno como los anticuerpos de interés en los métodos de la presente invención no se encuentran limitados de manera particular. Dichos anticuerpos de interés pueden reconocer cualquier antígeno. Los anticuerpos cuya farmacocinética debe mejorarse con los métodos de la presente descripción incluyen, por ejemplo, anticuerpos que reconocen los antígenos de membrana como las proteínas receptoras (receptores unidos a la membrana y receptores solubles) y marcadores en la superficie celular, y anticuerpos que reconocen antígenos solubles como citocinas. Los ejemplos preferidos de antígenos de membrana incluyen proteínas de membrana. Los ejemplos de antígenos solubles incluyen proteínas solubles. Los antígenos reconocidos por los anticuerpos cuya farmacocinética debe mejorarse con los métodos de la presente descripción incluyen, por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-31, IL-23, receptor de IL-2, receptor de IL-6, receptor de OSM, gpl 30, receptor de IL-5, CD40, CD4, Fas, osteopontina, CRTH2, CD26, PDGF-D, CD20, factor quimiotáctico de monocitos, CD23, TNF- α , HMGB-1, integrina α 4, IOAM-1, CCR2, CD1 la, CD3, IFN γ , BLYS, HLA-DR. TGF- β , CD52 y receptor de IL-31. Los antígenos particularmente preferidos incluyen el receptor de IL-6.

- 40 Además, la molécula de unión al antígeno de interés en los métodos de la presente descripción incluye las moléculas de unión al antígeno con una actividad antagonista (moléculas de unión al antígeno antagonistas) y moléculas de unión al antígeno con actividad agonista (moléculas de unión al antígeno agonistas). En una realización preferida, la molécula de unión al antígeno incluye moléculas de unión al antígeno antagonistas, en particular, moléculas de unión al antígeno antagonistas que reconocen los antígenos de membrana como receptores, o antígenos solubles como citocinas. Por ejemplo, una molécula de unión al antígeno antagonista que reconoce un receptor inhibe la unión entre el ligando y el receptor mediante la unión al receptor y, por lo tanto, inhibe la señalización mediada por el receptor.

- 50 La molécula de unión al antígeno de interés no se encuentra limitada de manera particular, y puede ser cualquier molécula de unión al antígeno. La molécula de unión al antígeno de la presente descripción incluye preferiblemente tanto actividad de unión al antígeno (región de unión al antígeno) como región de unión a FcRn. En particular, las moléculas de unión al antígeno preferidas incluyen una región que se une a FcRn humano. La molécula de unión al antígeno que incluye tanto la actividad de unión al antígeno como la región de unión a FcRn incluye, por ejemplo, anticuerpos. Los anticuerpos preferidos en el contexto de la presente descripción incluyen, por ejemplo, anticuerpos de IgG. Cuando el anticuerpo que se utiliza es un anticuerpo de IgG, el tipo de IgG no se encuentra limitado: se puede utilizar la IgG perteneciente a cualquier isotipo (subclase) como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

- 55 Además, se pueden introducir mutaciones de aminoácidos (*por ejemplo*, M73) en la región constante de cualquiera de estos isotipos de IgG. Las mutaciones de aminoácidos que se deben introducir incluyen, por ejemplo, las que potencian o afectan la unión al receptor Fc γ (Proc Natl Acad Sci USA. 14 marzo 2006;103(11):4005-10) y las que potencian o afectan la unión a FcRn (J Biol Chem. 2 marzo 2001;276(9):6591-604), pero no se limitan a estos

ejemplos. De manera alternativa, también es posible modificar la unión dependiente del pH mediante la selección de una región constante apropiada como IgG2.

- 5 Cuando la molécula de unión al antígeno de interés de la presente descripción es un anticuerpo, puede ser un anticuerpo derivado de cualquier animal, como un anticuerpo de ratón, anticuerpo de humano, anticuerpo de rata, anticuerpo de conejo, anticuerpo de cabra o anticuerpo de camello. Además, el anticuerpo puede ser un anticuerpo modificado, por ejemplo, un anticuerpo quimérico y, en particular, un anticuerpo modificado que incluye sustitución de aminoácidos en la secuencia de un anticuerpo humanizado, etc. Los anticuerpos también incluyen anticuerpos biespecíficos, productos de modificación de anticuerpos unidos a varias moléculas, y polipéptidos que incluyen fragmentos de anticuerpo.
- 10 Los "anticuerpos quiméricos" son anticuerpos preparados mediante la combinación de secuencias derivadas de distintos animales. De manera específica, el anticuerpo quimérico incluye, por ejemplo, anticuerpos con regiones variables (V) de cadena pesada y ligera de un anticuerpo de ratón y regiones constantes (C) de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano.
- 15 Los "anticuerpos humanizados", también denominados anticuerpos humanos remodelados, son anticuerpos en los cuales las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano, por ejemplo, un ratón, se trasplantan en las CDR de un anticuerpo humano. Los métodos para identificar las CDR son conocidos (Kabat *et al.*, Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia *et al.*, Nature (1989) 342:877). Las tecnologías de recombinación genética generales adecuadas a estos efectos también son conocidas (ver la solicitud de patente europea EP 125023; y WO 96/02576).
- 20 El anticuerpo biespecífico se refiere a un anticuerpo que tiene, en la misma molécula de anticuerpo, regiones variables que reconocen distintos epítopos. Un anticuerpo biespecífico puede ser un anticuerpo que reconoce dos o más antígenos distintos, o un anticuerpo que reconoce dos o más epítopos distintos en el mismo antígeno.
- Además, los polipéptidos que incluyen fragmentos de anticuerpo incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, scFv (Nat Biotechnol. septiembre 2005;23(9): 1126-36), anticuerpos de dominio (dAb) (WO 2004/058821, WO 2003/002609), scFv-Fc (WO 2005/03 7989), dAb-Fc y proteínas de fusión Fc. De estos, las moléculas que incluyen un dominio Fc presentan la actividad de unión a FcRn y, por lo tanto, son adecuadas para utilizarse en los métodos que se describen en la presente.
- 25 Además, las moléculas de unión al antígeno que son aplicables a la presente descripción pueden ser moléculas similares a anticuerpo. Una molécula similar a anticuerpo es una molécula que puede presentar funciones al unirse a una molécula diana (Current Opinion in Biotechnology 2006, 17:653-658; Current Opinion in Biotechnology 2007, 18:1-10; Current Opinion in Structural Biology 1997, 7:463-469; Protein Science 2006,15:14-27), e incluye, por ejemplo, DAJRPins (WO 2002/020565), Affibody (WO 1995/001937), Avimer (WO 2004/044011; WO 2005/040229) y Adnectin (WO 2002/032925). Si estas moléculas similares a anticuerpo pueden unirse a moléculas diana de manera dependiente del pH, es posible que una única molécula se una a varias moléculas diana.
- 30 Además, la molécula de unión al antígeno puede ser una proteína receptora o un Fc receptor, una proteína de fusión que se une a una diana, que incluye, por ejemplo, proteína de fusión TNFR-Fc, proteína de fusión ILIR-Fc, proteína de fusión VEGFR-Fc y proteína de fusión CTLA4-Fc (Nat Med. enero 2003;9(1):47-52; BioDrugs. 2006;20(3): 151-60). Si dichas proteínas receptoras y proteínas de fusión Fc receptoras pueden unirse a moléculas diana de manera dependiente del pH, es posible que una única molécula se una a varias moléculas diana.
- 35 Además, la molécula de unión al antígeno puede ser una proteína de ligando artificial o una proteína de fusión de ligando artificial que se une a una diana y tiene un efecto de neutralización e incluye, por ejemplo, IL-6 mutante (EMBO J. 15 diciembre 1994;13(24):5863-70). Si dichas proteínas de ligando artificial y proteínas de fusión de ligando artificial pueden unirse a moléculas diana de manera dependiente del pH, es posible que una única molécula se una a varias moléculas diana.
- 40 Además, los anticuerpos que se describen en la presente pueden incluir cadenas de azúcar modificadas. Los anticuerpos con cadenas de azúcar modificadas incluyen, por ejemplo, anticuerpos con glucosilación modificada (WO 99/54342), anticuerpos que carecen de fucosa que se agrega a la cadena de azúcar (WO 00/61739; WO 02/31140; WO 2006/067847; WO 2006/067913) y anticuerpos con cadenas de azúcar con GlcNAc bisectante (WO 02/79255).
- 45 Si bien los métodos que se describen en la presente no se limitan a ninguna teoría específica, la relación entre hacer que la capacidad de unión al antígeno a pH ácido se vuelva más débil en comparación con la capacidad a pH neutro, la mejora de la farmacocinética y la unión al antígeno varias veces se pueden explicar, por ejemplo, de la siguiente manera.
- 50 Por ejemplo, cuando el anticuerpo es un anticuerpo que se une a un antígeno de membrana, el anticuerpo que se administra al cuerpo se une al antígeno y luego se absorbe mediante internalización en los endosomas en las células junto con el antígeno y mientras el anticuerpo se mantiene unido al antígeno. Luego, el anticuerpo se transloca a lisosomas mientras el anticuerpo se mantiene unido al antígeno y el anticuerpo se degrada con el
- 55

lisosoma junto con el antígeno. La eliminación del plasma mediada por internalización se denomina eliminación dependiente del antígeno, y dicha eliminación se ha registrado con varias moléculas de anticuerpo (Drug Discov Today. enero 2006;1(1-2):81-8). Cuando una única molécula de anticuerpo de IgG se une a los antígenos de manera divalente, la única molécula de anticuerpo se internaliza mientras el anticuerpo se mantiene unido a dos moléculas de antígeno, y se degrada en el lisosoma. Por consiguiente, en el caso de anticuerpos típicos, una molécula de anticuerpo de IgG no puede unirse a tres o más moléculas del antígeno. Por ejemplo, una única molécula de anticuerpo de IgG con una actividad de neutralización no puede neutralizar tres o más moléculas de antígeno.

La retención relativamente prolongada (eliminación lenta) de moléculas de IgG en el plasma se debe a la función de FcRn que se conoce como receptor de rescate de moléculas de IgG. Cuando se absorben en endosomas mediante pinocitosis, las moléculas de IgG se unen a FcRn expresadas en los endosomas en condiciones ácidas en los endosomas. Si bien las moléculas de IgG que no se unieron a FcRn se transfieren a los lisosomas en los que se degradan, las moléculas de IgG que se unieron a FcRn se translocan a la superficie celular y regresan nuevamente al plasma al disociarse de FcRn en condiciones neutras en el plasma.

De manera alternativa, cuando el antígeno es un antígeno que se une a un antígeno soluble, el anticuerpo que se administra al cuerpo se une al antígeno y luego se absorbe en las células mientras el anticuerpo se mantiene unido al antígeno. Muchos anticuerpos absorbidos en las células se liberan al exterior de las células mediante FcRn. Sin embargo, dado que los anticuerpos se liberan al exterior de las células, con los anticuerpos unidos a los antígenos, los anticuerpos no pueden unirse a los antígenos nuevamente. Por lo tanto, de manera similar a los anticuerpos que se unen a los antígenos de membrana, en el caso de los anticuerpos típicos, una molécula de anticuerpo de IgG no puede unirse a tres o más moléculas del antígeno.

Los inventores de la presente razonaron que, cuando los anticuerpos que se unieron a los antígenos, como los antígenos de membrana, se absorben en los endosomas mediante internalización, mientras que los anticuerpos que se mantienen unidos a los antígenos se translocan a los lisosomas y se degradan, los anticuerpos de IgG cuyos antígenos se disocian en los endosomas podrían unirse a FcRn que se expresa en los endosomas. De manera específica, los inventores de la presente descubrieron que un anticuerpo que se une de manera potente a un antígeno en el plasma pero se une de manera débil al antígeno dentro del endosoma puede unirse a un antígeno en el plasma y absorberse mientras se mantiene formando un complejo con el antígeno en los endosomas en las células mediante internalización; disociarse del antígeno en el endosoma; luego unirse a FcRn y translocarse a la superficie celular; y regresar nuevamente al plasma en estado no unido a los antígenos para neutralizar varios antígenos unidos a la membrana. Además, los inventores de la presente descubrieron que un anticuerpo con la propiedad de unirse de manera potente a los antígenos en el plasma pero unirse de manera débil a los antígenos en el endosoma puede disociarse de los antígenos en el endosoma incluso cuando el anticuerpo se ha unido a los antígenos como antígenos solubles; por lo tanto, se liberan nuevamente en el plasma en estado no unido a los antígenos y pueden neutralizar varios antígenos solubles.

En particular, los inventores de la presente destacaron que el pH en el plasma era distinto del pH en los endosomas y, por lo tanto, descubrieron que los anticuerpos que se unieron de manera potente a los antígenos en condición de pH de plasma pero que se unieron de manera débil a los antígenos en condiciones de pH endosómico fueron superiores en la retención en el plasma, dado que una molécula de anticuerpo podría unirse a varios antígenos.

Los endosomas, que son vesículas de membrana, forman redes en el citoplasma de células eucariotas y son responsables del metabolismo de macromoléculas en el proceso desde la membrana celular a los lisosomas. Se ha indicado que el pH en los endosomas es generalmente un pH ácido de 5,5 a 6,0 (Nat Rev Mol Cell Biol. febrero 2004;5(2):121-32). Mientras tanto, se sabe que el pH en el plasma es casi neutro (normalmente, pH 7,4).

Por consiguiente, una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH ácido es más débil que la actividad de unión al antígeno a pH neutro se une al antígeno en el plasma con un pH neutro, se absorbe en las células y luego se disocia del antígeno en los endosomas con un pH ácido. La molécula de unión al antígeno que se disoció del antígeno se une a FcRn, se transloca a la superficie celular y regresa nuevamente al plasma en estado no unido a los antígenos. Como resultado, la molécula de unión al antígeno puede unirse a los antígenos varias veces y se mejora la farmacocinética.

Sustancias de molécula de unión al antígeno

Además, la presente descripción proporciona moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 4,0 a pH 6,5 es inferior que la actividad a pH 6,7 a pH 10,0, preferiblemente moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,0 a pH 6,0 es inferior que la actividad a pH 7,0 a 8,0. De manera específica, las moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 4,0 a pH 6,5 es inferior que la actividad a pH 6,7 a pH 10,0 incluyen, por ejemplo, las moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es inferior a la actividad a pH 7,4.

Las moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es inferior que la actividad a pH 7,4 también se pueden expresar como moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 7,4 es

superior a la actividad a pH 5,8.

Como en el caso de las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es inferior a la actividad a pH 7,4, en la medida en que la actividad de unión al antígeno a pH 5,8 sea inferior a la unión a pH 7,4, no hay limitación en la diferencia en la actividad de unión, y la actividad de unión al antígeno a pH 5,8 solamente debe ser inferior, incluso ligeramente.

Una realización preferida de una molécula de unión al antígeno de la presente descripción cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es inferior a la actividad a pH 7,4 incluye moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 7,4 es el doble o más que la actividad a pH 5,8. Una realización más preferida de la molécula de unión al antígeno incluye moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 7,4 es diez veces superior o más a la actividad a pH 5,8. Una realización aun más preferida de la molécula de unión al antígeno incluye moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 7,4 es 40 veces superior o más a la actividad a pH 5,8.

De manera específica, en una realización preferida, la molécula de unión al antígeno tiene una actividad de unión al antígeno a pH 5,8 que es inferior a la actividad a pH 7,4, en donde el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$, que es una relación de KD para el antígeno a pH 5,8 y a pH 7,4 es preferiblemente 2 o más, más preferiblemente 10 o más, y aun más preferiblemente 40 o más. El límite superior de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ no se limita de forma particular, y puede ser cualquier valor, por ejemplo, 400, 1000 o 10000, siempre que la producción sea posible con las tecnologías de los expertos en la técnica.

En otra realización preferida, la molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es inferior a la actividad a pH 7,4, tiene un valor de $k_d(pH5,8)/k_d(pH7,4)$, que es una relación de la kd para el antígeno a pH 5,8 y la kd para el antígeno a pH 7,4, que es 2 o superior, más preferiblemente 5 o superior, incluso más preferiblemente 10 o superior, y aun más preferiblemente 30 o superior. El límite superior al valor de $k_d(pH5,8)/k_d(pH7,4)$ no se encuentra limitado de manera particular, y puede ser cualquier valor, por ejemplo, 50, 100 o 200, en la medida en que la producción sea posible con las tecnologías de los expertos en la técnica.

Las condiciones distintas del pH al que se mide la actividad de unión al antígeno las pueden seleccionar de forma apropiada los expertos en la técnica y las condiciones no se encuentran limitadas de forma particular; sin embargo, las mediciones se pueden realizar, por ejemplo, en condiciones de amortiguador MES y 37 °C como se describe en los Ejemplos. Además, se puede determinar la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, con Biacore T100 (GE Healthcare) o similares, como se describe en los Ejemplos.

Se presume que dicha molécula de unión al antígeno, que se une de manera débil a un antígeno a pH ácido, se disocia fácilmente del antígeno en condiciones ácidas endosómicas, y que después de la internalización en las células, se une a FcRn y se libera fácilmente al exterior de las células. La molécula de unión al antígeno liberada al exterior de las células sin degradarse dentro de las células se puede unir nuevamente a otros antígenos. Por consiguiente, cuando la molécula de unión al antígeno es, por ejemplo, una molécula de neutralización de unión al antígeno, la molécula de unión al antígeno que se disocia fácilmente del antígeno en condiciones ácidas endosómicas se puede unir a y neutralizar los antígenos varias veces. Como resultado, las moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 4,0 a pH 6,5 es inferior a la actividad a pH 6,7 a pH 10,0 son superiores en la retención en el plasma.

En una realización preferida, la molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es inferior a la actividad a pH 7,4 incluye las moléculas de unión al antígeno en las que al menos un aminoácido en la molécula de unión al antígeno se sustituye con histidina o un aminoácido no natural, o en las que se ha insertado al menos una histidina o un aminoácido no natural. El sitio en el que se introduce la mutación de histidina o aminoácido no natural no se encuentra limitado de manera particular y puede ser cualquier sitio, en la medida en que la actividad de unión al antígeno a pH 5,8 sea más débil que la actividad a pH 7,4 (el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ es superior o el valor de $k_d(pH5,8)/k_d(pH7,4)$ es superior) en comparación con el momento anterior a la sustitución. Los ejemplos incluyen regiones variables y CDR de un anticuerpo en caso de que la molécula de unión al antígeno sea un anticuerpo. La cantidad de aminoácidos que se debe sustituir con histidina o un aminoácido no natural y la cantidad de aminoácidos que se debe insertar las pueden determinar de manera apropiada los expertos en la técnica. Se puede sustituir un aminoácido con histidina o un aminoácido no natural, o se puede insertar un aminoácido, o se pueden sustituir dos o más aminoácidos con histidina o aminoácidos no naturales, o se pueden insertar dos o más aminoácidos. Además, aparte de las sustituciones de histidina o un aminoácido no natural o la inserción de histidina o un aminoácido no natural, también se pueden llevar a cabo de manera simultánea la eliminación, adición, inserción y/o sustitución y similares de otros aminoácidos. Las sustituciones de histidina o un aminoácido no natural o la inserción de histidina o un aminoácido no natural se pueden llevar a cabo de manera aleatoria usando un método como barrido de histidina, que utiliza histidina en lugar de alanina en barrido de alanina, que es conocido por los expertos en la técnica. Las moléculas de unión al antígeno cuya $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ o $k_d(pH5,8)/k_d(pH7,4)$ aumenta en comparación con el momento anterior a la mutación se pueden seleccionar de las moléculas de unión al antígeno en las que se ha introducido una mutación de histidina o un aminoácido no natural de manera aleatoria.

Las moléculas de unión al antígeno preferidas con mutación de histidina o un aminoácido no natural y cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es inferior a la actividad a pH 7,4 incluyen, por ejemplo, moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 7,4 después de la mutación de histidina o un aminoácido no natural es equivalente a la actividad de unión al antígeno a pH 7,4 antes de la mutación de histidina o un aminoácido no natural. En la presente descripción, "una molécula de unión al antígeno después de la mutación de histidina o un aminoácido no natural tiene una actividad de unión al antígeno que es equivalente a la actividad de la molécula de unión al antígeno antes de la mutación de histidina o un aminoácido no natural" significa que, cuando la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno antes de la mutación de histidina o un aminoácido no natural se configura en 100 %, la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno después de la mutación de histidina o un aminoácido no natural es de al menos 10 % o más, preferiblemente 50 % o más, más preferiblemente 80 % o más, y aun más preferiblemente 90 % o más. La actividad de unión al antígeno a pH 7,4 después de la mutación de histidina o un aminoácido no natural puede ser superior a la actividad de unión al antígeno a pH 7,4 antes de la mutación de histidina o un aminoácido no natural. Cuando la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno disminuye debido a la sustitución o inserción de histidina o un aminoácido no natural, se puede ajustar la actividad de unión al antígeno mediante la introducción de sustitución, eliminación, adición y/o inserción y similares de uno o más aminoácidos en la molécula de unión al antígeno de manera que la actividad de unión al antígeno se vuelva equivalente a la actividad antes de la sustitución o inserción de histidina. La presente descripción también incluye dichas moléculas de unión al antígeno con una actividad de unión equivalente como resultado de la sustitución, eliminación, adición y/o inserción de uno o más aminoácidos después de la sustitución o inserción de histidina.

Además, cuando la molécula de unión al antígeno es una sustancia que incluye una región constante del anticuerpo, en otra realización preferida de la molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es inferior a la actividad a pH 7,4 la presente descripción incluye métodos para modificar las regiones constantes del anticuerpo contenidas en las moléculas de unión al antígeno. Los ejemplos específicos de regiones constantes de anticuerpo después de la modificación incluyen las regiones constantes que se describen en los Ejemplos.

Cuando la actividad de unión al antígeno de la sustancia de unión al antígeno a pH 5,8 se debilita en comparación con la actividad a pH 7,4 (cuando aumenta el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$) mediante los métodos descritos anteriormente y similares, generalmente se prefiere que el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ sea el doble o más, más preferiblemente cinco veces o más, y aun más preferiblemente diez veces o más en comparación con el del anticuerpo original, pero no se limita de manera particular a esto.

Las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción pueden tener además cualquier otra propiedad, en la medida en que su actividad de unión al antígeno a pH 4,0 a pH 6,5 sea inferior que la actividad a pH 6,7 a pH 10,0. Por ejemplo, las moléculas de unión al antígeno pueden ser moléculas de unión al antígeno agonistas o antagonistas. Las moléculas de unión al antígeno preferidas de la presente descripción incluyen, por ejemplo, moléculas de unión al antígeno antagonistas. En general, la molécula de unión al antígeno antagonista inhibe la señalización intracelular mediada por el receptor mediante la inhibición de la unión entre un ligando (agonista) y el receptor.

Además, la presente descripción proporciona anticuerpos en los cuales el aminoácido en al menos un sitio indicado más adelante se sustituye con histidina o un aminoácido no natural. Las posiciones de aminoácidos se indican en función de la numeración de Kabat (Kabat EA *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH).

Cadena pesada: H27, H31, H32, H33, H35, H50, H58, H59, H61, H62, H63, H64, H65, H99, H100b y H102.

Cadena ligera: L24, L27, L28, L32, L53, L54, L56, L90, L92 y L94

Entre los sitios que anteceden, H32, H61, L53, L90 y L94 podrían ser los sitios de modificación universales.

Cuando el antígeno es el receptor de IL-6 (por ejemplo, receptor de IL-6 humano), los sitios de modificación preferibles incluyen los siguientes. Sin embargo, los sitios de modificación no se encuentran limitados de manera particular a estos.

Cadena pesada: H27, H31, H32, H35, H50, H58, H61 H62, H63, H64, H65, H100b y H102

Cadena ligera: L24, L27, L28, L32, L53, L56, L90, L92 y L94

Cuando se sustituye histidina o un aminoácido no natural en varios sitios, las combinaciones preferidas de sitios de sustitución incluyen, por ejemplo, la combinación de H27, H31 y H35; la combinación de H27, H31, H32, H35, H58, H62 y H102; la combinación de L32 y L53; y la combinación de L28, L32 y L53. Además, las combinaciones preferidas de sitios de sustitución de cadenas pesadas y ligeras incluyen la combinación de H27, H31, L32 y L53.

Cuando el antígeno es IL-6 (por ejemplo, IL-6 humano), los sitios de modificación preferibles incluyen los siguientes. Sin embargo, los sitios de modificación no se encuentran limitados de manera particular a estos.

55 Cadena pesada: H32, H59, H61 y H99.

Cadena ligera: L53, L54, L90 y L94.

Cuando el antígeno es el receptor de IL-31 (por ejemplo, receptor de IL-31 humano), los sitios de modificación preferibles incluyen H33. Sin embargo, los sitios de modificación no se encuentran limitados de manera particular a estos.

- 5 Las moléculas de unión al antígeno que se describen en la presente pueden reconocer cualquier antígeno. Los antígenos reconocidos por los anticuerpos de la presente invención incluyen específicamente las proteínas receptoras mencionadas anteriormente (receptores unidos a la membrana o receptores solubles), antígenos de membrana como marcadores de la superficie celular y antígenos solubles como citocinas, por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-31, IL-23, receptor de IL-2, receptor de IL-6, receptor de OSM, gp130, receptor de IL-5, CD40, CD4, Fas, osteopontina, CRTH2, CD26, PDGF-D, CD20, factor quimioatractivo de monocitos, CD23, TNF- α , HMGB-1, α 4 integrina, ICAM-L CCR2, CD11a, CD3, IFN γ , BLYS, HLA-DR, TGF- β , CD52 y receptor de IL-31.

Los antígenos particularmente preferidos incluyen el receptor de IL-6.

Las moléculas de unión al antígeno que se describen en la presente se describieron anteriormente.

- 15 En una realización preferida de la presente invención, las moléculas de unión al antígeno incluyen anticuerpos. Los anticuerpos con actividad de unión al antígeno y región de unión a FcRn incluyen, por ejemplo, los anticuerpos de IgG. Cuando el anticuerpo utilizado es un anticuerpo de IgG, no existe limitación con respecto a su tipo. Es posible utilizar IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y similares.

- 20 El origen de los anticuerpos que se describen en la presente no se encuentra limitado de manera particular, y pueden ser de cualquier origen. Es posible utilizar, por ejemplo, anticuerpos de ratón, anticuerpos humanos, anticuerpos de rata, anticuerpos de conejo, anticuerpos de cabra, anticuerpos de camello y otros. Además, los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, los anticuerpos quiméricos que se describieron anteriormente y, en particular, los anticuerpos modificados con sustituciones de la secuencia de aminoácidos, como los anticuerpos humanizados.

- 25 Los anticuerpos también pueden ser los anticuerpos biespecíficos que se describieron anteriormente, productos de modificación de anticuerpos a los que se han unido varias moléculas, polipéptidos que incluyen fragmentos de anticuerpo y anticuerpos con cadenas de azúcar modificadas.

- 30 La generación de anticuerpos quiméricos es conocida. En el caso de un anticuerpo quimérico de ratón humano, por ejemplo, un ADN que codifica una región V de anticuerpo se puede unir a un ADN que codifica una región C de anticuerpo humano; este se puede insertar en un vector de expresión e introducir en un hospedador para producir el anticuerpo quimérico.

- 35 Los "anticuerpos humanizados" también se denominan anticuerpos humanos remodelados y son anticuerpos en los que la región determinante de complementariedad (CDR) de un mamífero no humano, por ejemplo, un ratón, se trasplanta en la CDR de un anticuerpo humano. Los métodos para identificar las CDR son conocidos (Kabat *et al.*, Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia *et al.*, Nature (1989) 342:877). Las tecnologías de recombinación genética generales adecuadas a estos efectos también son conocidas (ver la solicitud de patente europea EP 125023; y WO 96/02576). Los anticuerpos humanizados se pueden producir mediante métodos conocidos, por ejemplo, se puede determinar la CDR de un anticuerpo de ratón, y se obtiene un ADN que codifica un anticuerpo en el que la CDR se une a la región marco (FR) de un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanizados entonces se pueden producir mediante un sistema que utiliza vectores de expresión convencionales. Dichos ADN se pueden sintetizar mediante PCR utilizando como cebadores varios oligonucleótidos preparados para que algunas partes se superpongan con las regiones de extremo tanto de la CDR como de la FR (ver el método que se describe en WO 98/13388). Las FR de anticuerpo humano unidas mediante las CDR se seleccionan de manera que las CDR formen un sitio de unión al antígeno adecuado. Si fuera necesario, los aminoácidos en las FR de una región variable de anticuerpo se pueden sustituir de manera que las CDR del anticuerpo humano remodelado puedan formar un sitio de unión al antígeno adecuado (Sato, K. *et al.*, Cancer Res. (1993) 53:10.01-6). Los residuos de aminoácidos en las FR que se pueden modificar incluyen partes que se unen directamente a un antígeno mediante enlaces no covalentes (Amit *et al.*, Science (1986) 233: 747-53), partes que influyen o tienen un efecto en la estructura de la CDR (Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. (1987) 196: 901-17), y partes implicadas en las interacciones VH-VL (EP 239400).

- 50 Cuando los anticuerpos que se describen en la presente son anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados, las regiones C de estos anticuerpos derivan preferiblemente de anticuerpos humanos. Por ejemplo, se pueden utilizar C γ 1, C γ 2, C γ 3 y C γ 4 para la cadena H, mientras que se pueden utilizar C κ y C λ para la cadena L. Además, si fuera necesario, se pueden introducir mutaciones de aminoácidos en la región C de anticuerpo humano para potenciar o disminuir la unión al receptor Fc γ o FcRn o para mejorar la estabilidad o capacidad de producción del anticuerpo. Un anticuerpo quimérico que se describe en la presente incluye preferiblemente una región variable de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano y una región constante derivada de un anticuerpo humano. Mientras tanto, el anticuerpo humanizado incluye preferiblemente CDR de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano y FR y regiones C derivadas de un anticuerpo humano. Las regiones constantes derivadas de anticuerpos humanos

incluyen preferiblemente una región de unión a FcRn. Dichos anticuerpos incluyen, por ejemplo, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Las regiones constantes utilizadas para los anticuerpos humanizados que se describen en la presente pueden ser regiones constantes de anticuerpos de cualquier isotipo, se utiliza preferiblemente una región constante de IgG humana, si bien no se limita a esta. Las FR derivadas de un anticuerpo humano, que se utilizan para los anticuerpos humanizados, tampoco se limitan de manera particular, y pueden derivar de un anticuerpo de cualquier isotipo.

Las regiones variable y constante de los anticuerpos quiméricos y humanizados que se describen en la presente se pueden modificar mediante eliminación, sustitución, inserción y/o adición y similares, en la medida en que se muestre la especificidad de unión de los anticuerpos originales.

Dado que la inmunogenicidad disminuye en el cuerpo humano, se cree que los anticuerpos quiméricos y humanizados que utilizan secuencias derivadas de humanos son útiles cuando se administran a humanos con efectos terapéuticos o similares.

Los anticuerpos de la presente descripción se pueden preparar mediante cualquier método. Por ejemplo, los anticuerpos cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es originalmente superior o comparable a la actividad a pH 7,4 se pueden modificar de manera artificial mediante la sustitución de histidina que se describió anteriormente o similares, de manera que se reduzca su actividad de unión al antígeno a pH 5,8 con respecto a la actividad a pH 7,4.

De manera alternativa, los anticuerpos cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es inferior a la actividad a pH 7,4 se pueden seleccionar mediante el análisis de varios anticuerpos obtenidos de una genoteca de anticuerpos o hibridomas como se describe más adelante.

Cuando se sustituyen los aminoácidos en un anticuerpo con histidina, se pueden utilizar las secuencias conocidas para la secuencia de aminoácidos de cadena H o cadena L del anticuerpo antes de la introducción de las mutaciones de histidina, o también se pueden utilizar las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos recientemente obtenidos mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden obtener de una genoteca de anticuerpos, o se pueden obtener mediante la clonación de genes que codifican los anticuerpos de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales.

Con respecto a las genotecas de anticuerpos, ya se conocen muchas genotecas de anticuerpos, y también se conocen los métodos para producir las genotecas de anticuerpos; por lo tanto, los expertos en la técnica pueden obtener de manera apropiada las genotecas de anticuerpos. Por ejemplo, con relación a las genotecas de fagos de anticuerpos, podemos referirnos a bibliografía como Clackson *et al.*, Nature 1991, 352: 624-8; Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 1991, 222: 581-97; Waterhouses *et al.*, Nucleic Acids Res. 1993, 21: 2265-6; Griffiths *et al.*, EMBO J. 1994, 13: 324.0-60; Vaughan *et al.*, Nature Biotechnology 1996, 14: 309-14; y la publicación Kohyo de patente japonesa número (JP-A) H20-504970 (publicación en etapa nacional japonesa sin examinar que corresponde a una publicación internacional no japonesa). Además, es posible utilizar los métodos conocidos, como los métodos que utilizan células eucariotas como genotecas (WO 95/15393) y los métodos de expresión en ribosomas. Además, también se conocen las tecnologías para obtener anticuerpos humanos mediante cribado usando genotecas de anticuerpos humanos. Por ejemplo, las regiones variables de anticuerpos humanos se pueden expresar en la superficie de los fagos como anticuerpos de cadena simple (scFvs) usando métodos de expresión en fagos, y se pueden seleccionar los fagos que se unen a los antígenos. El análisis genético de los fagos seleccionados puede determinar las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de anticuerpos humanos que se unen a los antígenos. Una vez que se revelan las secuencias de ADN de scFvs que se unen a los antígenos, se pueden producir vectores de expresión adecuados en función de estas secuencias para obtener anticuerpos humanos. Estos métodos ya son conocidos, y nos podemos referir a WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 y WO 95/15388.

En cuanto a los métodos para obtener genes que codifican anticuerpos a partir de hibridomas, se pueden utilizar de forma básica las tecnologías conocidas que implican el uso de antígenos deseados o células que expresan los antígenos deseados como antígenos de sensibilización, utilizándolos para realizar las inmunizaciones de acuerdo con los métodos de inmunización convencionales, fusionando las células inmunitarias resultantes con las células originales conocidas mediante métodos de fusión celular convencionales, analizando las células que producen anticuerpos monoclonales (hibridomas) mediante métodos de selección convencionales, sintetizando los ADNc de las regiones variables del anticuerpo (regiones V) de ARNm de los hibridomas obtenidos usando transcriptasa inversa y uniéndolos con los ADN que codifican las regiones constantes de anticuerpo (regiones C) deseadas.

Más específicamente, los antígenos de sensibilización para obtener los genes de anticuerpo que se describieron anteriormente que codifican las cadenas H y las cadenas L incluyen tanto antígenos completos con inmunogenicidad como antígenos incompletos que incluyen haptenos y similares sin antigenicidad; sin embargo, no se limitan a estos ejemplos. Por ejemplo, es posible utilizar proteínas enteras y péptidos parciales de proteínas de interés. Además, se sabe que las sustancias que comprenden polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y similares pueden ser antígenos. Por lo tanto, los antígenos de los anticuerpos que se describen en la presente no se encuentran limitados de manera particular. Los antígenos se pueden preparar mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante métodos basados en baculovirus (por ejemplo, WO 98/46777) y similares. Se pueden producir

5 hibridomas, por ejemplo, mediante el método de Milstein *et al.* (G. Kohler y C. Milstein, *Methods Enzymol.* 1981, 73: 3-46) y similares. Cuando la inmunogenicidad de un antígeno es baja, se puede realizar inmunización después de unir el antígeno con una macromolécula con inmunogenicidad, como albúmina. De manera alternativa, si fuera necesario, los antígenos se pueden convertir en antígenos solubles al unirlos con otras moléculas. Cuando se utilizan moléculas transmembrana como los antígenos de membrana (por ejemplo, receptores) como antígenos, se pueden utilizar partes de las regiones extracelulares de los antígenos de membrana como fragmento, o se pueden utilizar células que expresan moléculas transmembrana en su superficie celular como inmunógenos.

10 Las células que producen anticuerpos se pueden obtener mediante la inmunización de los animales con antígenos de sensibilización apropiados que se describieron anteriormente. De manera alternativa, las células que producen anticuerpos se pueden preparar mediante inmunización *in vitro* de linfocitos que pueden producir anticuerpos. Se pueden utilizar varios mamíferos para la inmunización: los animales comúnmente utilizados incluyen roedores, lagomorfos y primates. Dichos animales incluyen, por ejemplo, roedores como ratones, ratas y hámsters; lagomorfos como conejos; y primates que incluyen monos como monos cynomolgus, monos rhesus, babuinos y chimpancés. Además, los animales transgénicos que portan repertorios de genes de anticuerpo humano también son conocidos, y los anticuerpos humanos se pueden obtener mediante el uso de estos animales (ver WO 96/34096; Mendez *et al.*, *Nat. Genet.* 1997, 15: 146-56). En lugar de utilizar dichos animales transgénicos, por ejemplo, los anticuerpos humanos deseados con actividad de unión contra antígenos se pueden obtener mediante sensibilización *in vitro* de linfocitos humanos con antígenos deseados o células que expresan los antígenos deseados, y luego fusión de los linfocitos sensibilizados con células de mieloma humano como U266 (ver la publicación Kokoku de solicitud de patente japonesa número (JP-B) HOI-59878 (solicitud de patente japonesa aprobada y examinada publicada por oposición)). Además, los anticuerpos humanos deseados se pueden obtener mediante inmunización de animales transgénicos que portan un repertorio completo de los genes de anticuerpo humano, con antígenos deseados (ver WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 96/34096 y WO 96/33735).

25 La inmunización de animales se puede realizar mediante dilución y suspensión apropiada de un antígeno de sensibilización en solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica o similares, y mezclándolo con un adyuvante para emulsionarlo, si fuera necesario. Luego esto se inyecta por vía intraperitoneal o subcutánea en los animales. Luego, el antígeno de sensibilización mezclado con adyuvante incompleto de Freund se administra preferiblemente varias veces cada cuatro a 21 días. La producción de anticuerpo se puede confirmar al medir la titulación del anticuerpo de interés en suero animal con métodos convencionales.

30 Las células que producen anticuerpo obtenidas de linfocitos o animales inmunizados con un antígeno deseado se pueden fusionar con células de mieloma para generar hibridomas usando agentes de fusión convencionales (por ejemplo, polietilenglicol) (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986, 59-103). Cuando sea necesario, las células de hibridoma se pueden cultivar y desarrollar, y se puede medir la especificidad de unión del anticuerpo producido a partir de estos hibridomas usando métodos de selección conocidos, como inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA) y ensayo inmunoabsorbente unido a la enzima (ELISA). Luego, los anticuerpos de interés que producen hibridomas cuya especificidad, afinidad o actividad se ha determinado se pueden subclonar mediante métodos como dilución limitada.

35 A continuación, los genes que codifican los anticuerpos seleccionados se pueden clonar a partir de hibridomas o células que producen anticuerpos (linfocitos sensibilizados y similares) usando sondas que se pueden unir específicamente a los anticuerpos (por ejemplo, oligonucleótidos complementarios a las secuencias que codifican las regiones constantes del anticuerpo). También es posible clonar los genes de ARNm usando RT-PCR. Las inmunoglobulinas se clasifican en cinco clases distintas, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Estas clases se dividen de manera adicional en varias subclases (isotipos) (por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG-4; IgA-1 e IgA-2; y similares). Las cadenas H y las cadenas L utilizadas en la presente descripción para producir anticuerpos no se encuentran limitadas de manera particular y se pueden originar de anticuerpos que pertenecen a cualquiera de estas clases o subclases; sin embargo, se prefiere particularmente IgG.

40 En la presente memoria, es posible modificar los genes que codifican la cadena H y los genes que codifican la cadena L usando tecnologías de ingeniería genética. Los anticuerpos modificados genéticamente, como los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos humanizados, que se han modificado artificialmente a los efectos de disminuir la inmunogenicidad heteróloga y similares contra humanos, se pueden producir de manera apropiada para anticuerpos como anticuerpos de ratón, anticuerpos de rata, anticuerpos de conejo, anticuerpos de hámster, anticuerpos de oveja y anticuerpos de camello. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos que incluyen las regiones variables de cadena H y cadena L de anticuerpo de mamífero no humano, como anticuerpo de ratón, y las regiones constantes de cadena H y cadena L de anticuerpo humano. Los anticuerpos quiméricos se pueden obtener ligando un ADN que codifica una región variable de un anticuerpo de ratón a un ADN que codifica una región constante de un anticuerpo humano, insertándolo en un vector de expresión e introduciendo el vector en un hospedador para producir el anticuerpo. Un anticuerpo humanizado, que también se denomina anticuerpo humano remodelado, se puede sintetizar mediante PCR usando varios oligonucleótidos producidos de manera que tengan partes superpuestas en los extremos de las secuencias de ADN diseñadas para unir las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo de un mamífero no humano, como un ratón. El ADN resultante se puede ligar a un ADN que codifica una región constante de anticuerpo humano. El ADN ligado se puede insertar en un vector de expresión, y el vector se puede introducir en un hospedador para producir el anticuerpo (ver EP 239400

y WO 96/02576). Las FR de anticuerpo humano que se ligan mediante la CDR se seleccionan cuando la CDR forma un sitio de unión al antígeno favorable. Si fuera necesario, los aminoácidos en la región marco de una región variable del anticuerpo se pueden sustituir de manera que la CDR del anticuerpo humano remodelado forme un sitio de unión al antígeno apropiado (K. Sato *et al.*, Cancer Res. 1993, 53: 10.01-10.06).

5 Además de la humanización que se describió anteriormente, los anticuerpos se pueden modificar para mejorar sus propiedades biológicas, por ejemplo, la unión al antígeno. En la presente descripción, dichas modificaciones se pueden lograr mediante métodos como mutagénesis dirigida al sitio (ver, por ejemplo, Kunkel (19.10.0) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488), mutagénesis de PCR y mutagénesis de casete. En general, los anticuerpos mutantes
 10 cuyas propiedades biológicas se han mejorado muestran homología y/o similitud de secuencia de aminoácidos de 70 % o más, más preferiblemente 80 % o más, y aun más preferiblemente 90 % o más (por ejemplo, 95 % o más, 97 %, 98 % o 99 %), en comparación con la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo original. En la presente memoria, la homología y/o similitud de secuencia se define como la relación de los residuos de aminoácidos que son homólogos (mismo residuo) o similares (residuos de aminoácidos, clasificados en el mismo grupo basado en las propiedades generales de las cadenas laterales de aminoácidos) con los residuos de
 15 anticuerpo originales, después de haber maximizado el valor de homología de secuencia mediante alineación de secuencia e introducción de huecos, si fuera necesario. En general, los residuos de aminoácidos naturales se clasifican en grupos en función de las características de sus cadenas laterales de la siguiente manera:

- (1) hidrofóbicos: alanina, isoleucina, valina, metionina y leucina;
- (2) hidrofílicos neutrales: asparagina, glutamina, cisteína, treonina y serina;
- 20 (3) ácidos: ácido aspártico y ácido glutámico;
- (4) básicos: arginina, histidina y lisina;
- (5) residuos que afectan la orientación de la cadena: glicina y prolina; y
- (6) aromáticos: tirosina, triptófano y fenilalanina.

25 En general, un total de seis regiones determinantes de complementariedad (CDR; regiones hipervariables) presentes en las regiones variables de cadena H y cadena L interactúan entre sí para formar un sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. También se sabe que una región variable sola puede reconocer y unirse a un antígeno, si bien su afinidad es inferior a la afinidad del sitio de unión total. Por lo tanto, los genes de anticuerpo que codifican la cadena H y la cadena L que se describen en la presente pueden codificar fragmentos, cada uno de los cuales incluye el sitio de unión al antígeno de cadena H o cadena L, en la medida en que el polipéptido codificado por el
 30 gen retenga la actividad de unión al antígeno deseado.

Como se describió anteriormente, la región variable de cadena pesada en general está compuesta por tres CDR y cuatro FR. En una realización preferida, los residuos de aminoácidos que se van a "modificar" se pueden seleccionar de manera apropiada de residuos de aminoácidos, por ejemplo, en una CDR o FR. En general, las modificaciones de residuos de aminoácidos en las CDR pueden reducir la capacidad de unión al antígeno. Por lo tanto, los residuos
 35 de aminoácidos apropiados que se van a "modificar" se seleccionan preferiblemente de residuos de aminoácidos en las FR, pero no se limitan a estos.

Es posible seleccionar aminoácidos en una CDR en la medida en que se haya confirmado que la modificación no reduce la capacidad de unión. De manera alternativa, mediante el uso de bases de datos públicas o similares, los expertos en la técnica pueden obtener secuencias apropiadas que se pueden utilizar como una FR de región
 40 variable de anticuerpo de un organismo como humano o ratón.

Además, la presente descripción proporciona genes que codifican los anticuerpos que se describen en la presente. Los genes que codifican los anticuerpos de la presente invención puede ser cualquier gen, y puede ser ADN, ARN, análogos de ácido nucleico, o similares.

45 Además, la presente descripción también proporciona células hospedadoras que portan los genes que se describieron anteriormente. Las células hospedadoras no se limitan de manera particular e incluyen, por ejemplo, *E. coli* y varias células animales. Las células hospedadoras se pueden utilizar, por ejemplo, como un sistema de producción para producir y expresar los anticuerpos de la presente invención. Los sistemas de producción *in vitro* e *in vivo* se encuentran disponibles para los sistemas de producción de polipéptidos. Dichos sistemas de producción *in vitro* incluyen, por ejemplo, sistemas de producción que usan células eucariotas o células procariotas.

50 Las células eucariotas que se pueden utilizar como células hospedadoras incluyen, por ejemplo, células animales, células vegetales y células fúngicas. Las células animales incluyen: células de mamífero, por ejemplo, CHO (J. Exp. Med. (1995) 108: 94.0), COS, HEK293, 3T3, mieloma, BHK (riñón de cría de hámster), HeLa, y Vero; células de anfibio como *Xenopus laevis* oocytes (Valle *et al.*, Nature (19S1) 291: 338-340); y células de insecto como Sf9, Sf21 y Tn5. Se utilizan preferiblemente CHO-DG44, CHO-DX11B, células COS7, células HEK293 y células BHK para

expresar los anticuerpos de la presente invención. Entre las células animales, las células CHO son particularmente preferibles para la expresión a gran escala. Los vectores se pueden introducir en células hospedadoras, por ejemplo, mediante métodos de fosfato de calcio, métodos de DEAE-dextrano, métodos que utilizan DOTAP de liposomas catiónicos (Boehringer-Mannheim), métodos de electroporación y métodos de lipofección.

5 Con respecto a las células vegetales, por ejemplo, células derivadas de *Nicotiana tabacum* y lentejas de agua (*Lemna minor*) son conocidos como sistema de producción de proteína. Se pueden cultivar callos a partir de estas células para producir los anticuerpos de la presente invención. Con respecto a las células fúngicas, los sistemas de expresión de proteína conocidos son los que utilizan células de levadura, por ejemplo, células de género *Saccharomyces* (como, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pombe*); y células de hongos filamentosos, por ejemplo, género *Aspergillus* (como *Aspergillus niger*). Estas células se pueden utilizar como hospedador para producir los anticuerpos que se describen en la presente.

10 Las células bacterianas se pueden utilizar en los sistemas de producción procariotas. Con respecto a las células bacterianas, los sistemas de producción que utilizan *Bacillus subtilis* son conocidos además de los sistemas de producción que utilizan *E. coli* que se describieron anteriormente. Dichos sistemas se pueden utilizar para producir los anticuerpos que se describen en la presente.

Métodos de selección

La presente descripción proporciona métodos de selección de moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH ácido es inferior a la actividad a pH neutro. La presente descripción también proporciona métodos de selección de moléculas de unión al antígeno que se pueden unir de manera individual a varios antígenos. La presente descripción también proporciona métodos de selección de moléculas de unión al antígeno que son superiores en la retención en plasma. La presente descripción también proporciona métodos de selección de una molécula de unión al antígeno que se disocia dentro de una célula de un antígeno unido de manera extracelular. La presente descripción también proporciona métodos de selección de una molécula de unión al antígeno que se une a un antígeno e internaliza en una célula, y se libera al exterior de la célula de forma libre de antígeno. La presente descripción también proporciona métodos de selección de una molécula de unión al antígeno que ha aumentado la capacidad de eliminar antígenos en plasma. Además, la presente descripción también proporciona métodos de selección de moléculas de unión al antígeno que son particularmente útiles cuando se utilizan como composiciones farmacéuticas.

De manera específica, la presente descripción proporciona métodos de selección de moléculas de unión al antígeno que comprenden las etapas de:

- (a) determinar la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0;
- (b) determinar la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 4,0 a pH 6,5; y
- (c) seleccionar una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0 sea superior a la actividad de unión al antígeno a pH 4,0 a pH 6,5.

35 En los métodos de selección que se describen en la presente, la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0 no se encuentra limitada de manera particular, en la medida en que sea una actividad de unión al antígeno a pH entre pH 6,7 y pH 10,0. Sin embargo, por ejemplo, una actividad de unión al antígeno preferido es una actividad de unión al antígeno a un pH entre pH 7,0 y pH 8,0, y una actividad de unión al antígeno más preferida es una actividad de unión al antígeno a pH 7,4. Además, la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 4,0 a pH 6,5 no se encuentra limitada de manera particular, en la medida en que sea una actividad de unión al antígeno a pH entre pH 4,0 y pH 6,5. Sin embargo, por ejemplo, una actividad de unión al antígeno preferida es una actividad de unión al antígeno a pH entre pH 5,5 y pH 6,5 y una actividad de unión al antígeno preferida es una actividad de unión al antígeno a pH 5,8 o pH 5,5.

45 La actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno se puede determinar mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica pueden determinar de manera apropiada las condiciones distintas del pH. La actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno se puede evaluar como constante de disociación (KD), constante de disociación evidente (KD evidente), velocidad de disociación (k_d), velocidad de disociación evidente (k_d evidente) o similares. Estas constantes se pueden determinar mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, con Biacore (GE healthcare), gráfica Scatchard, o FACS.

En la presente memoria, "la etapa de selección de una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0 es superior a la actividad a pH 4,0 a pH 6,5" tiene el mismo significado que "la etapa de selección de una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 4,0 a pH 6,5 es inferior a la actividad a pH 6,7 a pH 10,0".

55 La diferencia entre la actividad de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0 y la actividad a pH 4,0 a pH 6,5 no se limita de manera particular en la medida en que la actividad de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0 sea superior a la

actividad a pH 4,0 a pH 6,5. Sin embargo, la actividad de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0 es preferiblemente el doble o más, más preferiblemente diez veces o más, y aun más preferiblemente 40 veces o más que la actividad de unión al antígeno a pH 4,0 a pH 6,5.

5 Además, la presente descripción también proporciona métodos de selección de moléculas de unión al antígeno que comprenden las etapas de:

- (a) unir una molécula de unión al antígeno a un antígeno a pH 6,7 a pH 10,0;
- (b) colocar la molécula de unión al antígeno que se unió al antígeno de (a) a pH 4,0 a pH 6,5; y
- (c) obtener la molécula de unión al antígeno que se disoció a pH 4,0 a pH 6,5.

10 Además, la presente descripción también proporciona métodos de selección de moléculas de unión al antígeno que comprenden las etapas de:

- (a) seleccionar una molécula de unión al antígeno que no se une a un antígeno a pH 4,0 a pH 6,5;
- (b) unir la molécula de unión al antígeno seleccionada en (a) a un antígeno a pH 6,7 a pH 10,0; y
- (c) obtener la molécula de unión al antígeno que se unió al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0.

15 Además, la presente descripción también proporciona métodos de selección de moléculas de unión al antígeno que comprenden las etapas de:

- (a) unir una molécula de unión al antígeno a un antígeno a pH 6,7 a pH 10,0;
- (b) colocar la molécula de unión al antígeno que se unió al antígeno de (a) a pH 4,0 a pH 6,5;
- (c) obtener la molécula de unión al antígeno que se disoció a pH 4,0 a pH 6,5;
- (d) amplificar el gen que codifica la molécula de unión al antígeno que se disoció; y

20 (e) obtener la molécula de unión al antígeno eluida.

Se pueden repetir las etapas (a) a (d) dos veces o más. Por lo tanto, la presente descripción proporciona los métodos que se describieron anteriormente que incluyen además una etapa de repetir las etapas de (a) a (d) dos veces o más. La cantidad de veces que se pueden repetir las etapas de (a) a (d) no se encuentra limitada de manera particular; sin embargo, la cantidad en general es de 10 veces o menos.

25 Además, la presente descripción también proporciona métodos de selección de moléculas de unión al antígeno que comprenden las etapas de:

- (a) seleccionar una molécula de unión al antígeno que no se une a un antígeno a pH 4,0 a pH 6,5;
- (b) unir la molécula de unión al antígeno seleccionada en (a) a un antígeno a pH 6,7 a pH 10,0;
- (c) obtener la molécula de unión al antígeno que se unió al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0;
- (d) amplificar el gen que codifica la molécula de unión al antígeno que se disoció; y
- (e) recoger la molécula de unión al antígeno eluida.

30 Se pueden repetir las etapas (a) a (d) dos veces o más. Por lo tanto, la presente descripción proporciona los métodos que se describieron anteriormente que incluyen además una etapa de repetir las etapas de

35 (a) a (d) dos veces o más. La cantidad de veces que se pueden repetir las etapas de (a) a (d) no se encuentra limitada de manera particular; sin embargo, la cantidad en general es de diez veces o menos.

Cuando la genoteca de fagos o similares se utiliza en los métodos de selección que se describen en la presente, la etapa de amplificar el gen que codifica la molécula de unión al antígeno también puede ser una etapa de amplificar fagos.

40 En los métodos que se describen en la presente, la unión de la molécula de unión al antígeno y el antígeno se puede realizar en cualquier estado, sin limitación particular. Por ejemplo, la unión de la molécula de unión al antígeno y el antígeno se puede realizar al contactar un antígeno con una molécula de unión al antígeno inmovilizada, o al contactar una molécula de unión al antígeno con un antígeno inmovilizado. De manera alternativa, la unión de la

molécula de unión al antígeno y el antígeno se puede realizar al contactar el antígeno y la molécula de unión al antígeno en una solución.

Además, la presente descripción también proporciona métodos de selección de moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH sea superior a la actividad a un segundo pH, que comprende las etapas de:

- 5 (a) unir una molécula de unión al antígeno a una columna inmovilizada con antígeno a un primer pH;
- (b) eluir la molécula de unión al antígeno que se ha unido a la columna al primer pH de la columna a un segundo pH; y
- (c) obtener la molécula de unión al antígeno eluida.

10 Además, la presente descripción también proporciona métodos de selección de moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH sea menor que la actividad a un segundo pH, que comprende las etapas de:

- (a) pasar una molécula de unión al antígeno a través de una columna inmovilizada con antígeno a un primer pH;
- (b) recoger la molécula de unión al antígeno que se eluyó sin unirse a la columna en la etapa (a);
- (c) unir la molécula de unión al antígeno recogida en (b) a una columna a un segundo pH; y
- 15 (d) obtener la molécula de unión al antígeno que se unió a la columna en la etapa (c).

Además, la presente descripción también proporciona métodos de selección de moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH sea superior a la actividad a un segundo pH, que comprende las etapas de:

- (a) unir una genoteca de molécula de unión al antígeno a una columna inmovilizada con antígeno a un primer pH;
- 20 (b) eluir la molécula de unión al antígeno de la columna a un segundo pH;
- (c) amplificar el gen que codifica la molécula de unión al antígeno eluida; y
- (d) obtener la molécula de unión al antígeno eluida.

25 Se pueden repetir las etapas (a) a (c) dos veces o más. Por lo tanto, la presente descripción proporciona los métodos que se describieron anteriormente que incluyen además la etapa de repetir las etapas de (a) a (c) dos veces o más. La cantidad de veces que se pueden repetir las etapas de (a) a (c) no se encuentra limitada de manera particular; sin embargo, la cantidad en general es de diez veces o menos.

30 En la presente descripción, cada uno del primer y segundo pH puede ser cualquier pH, en la medida en que no sean idénticos. En una combinación preferida del primer y segundo pH, por ejemplo, el primer pH es entre pH 6,7 y pH 10,0, y el segundo pH es entre pH 4,0 y pH 6,5 en una combinación más preferida, el primer pH es entre pH 7,0 y pH 8,0 y el segundo pH es entre pH 5,5 y pH 6,5, y en una combinación aun más preferida, el primer pH es pH 7,4 y el segundo pH es pH 5,8 o pH 5,5.

35 En otra combinación preferida del primer y segundo pH, por ejemplo, el primer pH es entre pH 4,0 y pH 6,5, y el segundo pH es entre pH 6,7 y pH 10,0; en una combinación más preferida, el primer pH es entre pH 5,5 y pH 6,5 y el segundo pH es entre pH 7,0 y pH 8,0; y en una combinación aun más preferida, el primer pH es pH 5,8 o pH 5,5 y el segundo pH es pH 7,4.

40 Las moléculas de unión al antígeno que se seleccionan mediante los métodos que se describen en la presente pueden ser cualquier molécula de unión al antígeno. Por ejemplo, es posible utilizar las moléculas de unión al antígeno que se describieron anteriormente en el análisis que se describe en la presente. Por ejemplo, es posible seleccionar moléculas de unión al antígeno que incluyen moléculas de unión al antígeno o secuencias naturales que incluyen las secuencias de aminoácidos con sustituciones. Las moléculas de unión al antígeno preferidas que se seleccionan en la presente descripción incluyen, por ejemplo, moléculas de unión al antígeno en las que al menos un aminoácido se sustituye con histidina o se inserta al menos una histidina. El sitio de introducción de sustitución o inserción de histidina no se encuentra limitado de manera particular, y se pueden introducir en cualquier sitio.

45 Además, la sustitución o inserción de histidina se pueden introducir en un sitio, o se pueden introducir en dos o más sitios. Además, las moléculas de unión al antígeno preferidas que se seleccionan en la presente descripción incluyen, por ejemplo, las moléculas de unión al antígeno que incluyen regiones constantes de anticuerpo modificadas.

Las moléculas de unión al antígeno que se seleccionan mediante los métodos que se describen en la presente

pueden ser varias moléculas de unión al antígeno distintas introducidas con sustituciones o inserciones de histidina en distintos sitios, por ejemplo, mediante barrido de histidina.

5 Por lo tanto, los métodos de selección que se describen en la presente pueden comprender además la etapa de sustituir al menos un aminoácido en la molécula de unión al antígeno con histidina o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno.

En los métodos de selección que se describen en la presente, se pueden utilizar aminoácidos no naturales en lugar de histidina. Por lo tanto, la presente invención también se puede comprender reemplazando la histidina mencionada anteriormente con aminoácidos no naturales.

10 Además, los métodos de selección de la presente invención pueden comprender además, la etapa de modificar los aminoácidos de regiones constantes del anticuerpo.

15 Las sustancias de unión al antígeno que se seleccionan mediante los métodos de selección que se describen en la presente se pueden preparar mediante cualquier método. Por ejemplo, es posible utilizar anticuerpos preexistentes, genotecas preexistentes (genotecas de fagos y similares), anticuerpos y genotecas que se preparan a partir de hibridomas obtenidos mediante la inmunización de animales o a partir de linfocitos B de animales inmunizados, anticuerpos y genotecas (genotecas con alto contenido de histidina o un aminoácido no natural, genotecas introducidas con histidina o un aminoácido no natural en sitios específicos y similares) preparados mediante la introducción de mutaciones de histidina o mutaciones de aminoácidos no naturales en los anticuerpos y genotecas mencionados anteriormente, etc.

20 Las moléculas de unión al antígeno que se unen a los antígenos varias veces que, por lo tanto, son superiores en la retención en plasma, se pueden obtener mediante los métodos de selección que se describen en la presente.

Por lo tanto, los métodos de selección que se describen en la presente se pueden utilizar como métodos de selección para obtener moléculas de unión al antígeno que sean superiores en la retención en plasma.

25 Además, las moléculas de unión al antígeno que se pueden unir al antígeno dos o más veces cuando se administran a animales como humanos, ratones o monos se pueden obtener mediante los métodos de selección de la presente invención. Por lo tanto, los métodos de selección que se describen en la presente se pueden utilizar como métodos de selección para obtener moléculas de unión al antígeno que se puedan unir al antígeno dos o más veces.

Además, las moléculas de unión al antígeno que pueden unirse a más antígenos en comparación con la cantidad de sus sitios de unión al antígeno cuando se administran a animales como humanos, ratones o monos se pueden obtener mediante los métodos de selección que se describen en la presente.

30 Por lo tanto, los métodos de selección que se describen en la presente se pueden utilizar como métodos de selección para obtener moléculas de unión al antígeno que puedan unirse a más antígenos en comparación con la cantidad de sus sitios de unión al antígeno. Por ejemplo, cuando el anticuerpo es un anticuerpo de neutralización, los métodos de selección de la presente invención se pueden utilizar como métodos de selección para obtener moléculas de unión al antígeno que puedan neutralizar más antígenos en comparación con la cantidad de los sitios de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno.

35 Además, las moléculas de unión al antígeno que se pueden disociar dentro de una célula de un antígeno unido de manera extracelular cuando se administran a animales como humanos, ratones o monos se pueden obtener mediante los métodos de selección de la presente invención. Por lo tanto, los métodos de selección que se describen en la presente se pueden utilizar como métodos de selección para obtener moléculas de unión al antígeno que puedan disociarse dentro de una célula de un antígeno unido de manera extracelular.

40 Además, las moléculas de unión al antígeno que se unen a un antígeno e internalizan en una célula y se liberan al exterior de la célula de forma libre de antígeno cuando se administran a animales como humanos, ratones o monos se pueden obtener mediante los métodos de selección que se describen en la presente. Por lo tanto, los métodos de selección que se describen en la presente se pueden utilizar como métodos de selección para obtener moléculas de unión al antígeno que se unan a un antígeno e internalicen en una célula, y se liberen al exterior de la célula de forma libre de antígeno.

45 Además, las moléculas de unión al antígeno que pueden eliminar antígenos de forma rápida en plasma cuando se administran a animales como humanos, ratones o monos se pueden obtener mediante los métodos de selección que se describen en la presente. Por lo tanto, los métodos de selección que se describen en la presente se pueden utilizar como métodos de selección para obtener moléculas de unión al antígeno con mayor (alta) capacidad de eliminación de antígenos en plasma.

50 Además, se espera que dichas moléculas de unión al antígeno sean particularmente superiores como agentes farmacéuticos, dado que se pueden reducir la dosis y frecuencia de administración en los pacientes y, como resultado, se puede reducir la dosificación total. Por lo tanto, los métodos de selección que se describen en la presente se pueden utilizar como métodos de selección para las moléculas de unión al antígeno para su uso como

55

composiciones farmacéuticas.

Además, la presente descripción proporciona genotecas en las que el contenido de histidina aumenta en comparación con las genotecas originales. Las genotecas que contienen moléculas de unión al antígeno con un mayor contenido de histidina se pueden utilizar en los métodos de selección que se describieron anteriormente y los métodos de producción que se describen más adelante en la presente.

Las genotecas con un mayor contenido de histidina se pueden preparar mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen el siguiente método. Se pueden incorporar 20 tipos de codones tripletes (trinucleótidos) que codifican 20 tipos de aminoácidos en la misma frecuencia cuando se sintetizan ácidos nucleicos para preparar una genoteca mediante el método de trinucleótido (J Mol Biol. 2008 F« 29; 376(4): 1182-200). Como resultado, se puede hacer que la posición mutada para la genoteca contenga 20 tipos de aminoácidos con la misma probabilidad. La frecuencia de histidina en la posición mutada para la genoteca puede aumentar al aumentar la proporción de un trinucleótido que codifica histidina en comparación con los aminoácidos restantes entre los 20 tipos en la síntesis.

Métodos para producir moléculas de unión al antígeno

La presente descripción proporciona métodos para producir moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH endosómico sea inferior a la actividad a pH de plasma. La presente descripción también proporciona métodos para producir moléculas de unión al antígeno que sean superiores en la retención en plasma. La presente descripción también proporciona métodos para producir moléculas de unión al antígeno que sean particularmente útiles cuando se utilizan como composiciones farmacéuticas. Específicamente, la presente descripción proporciona métodos para producir moléculas de unión al antígeno, que comprenden las etapas de:

- (a) determinar la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0;
- (b) determinar la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 4,0 a pH 6,5;
- (c) seleccionar una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0 sea superior a la actividad a pH 4,0 a pH 6,5;
- (d) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno que se selecciona en (c); y
- (e) producir la molécula de unión al antígeno con el gen obtenido en (d).

La presente descripción también proporciona métodos para producir moléculas de unión al antígeno, que comprenden las etapas de:

- (a) unir una molécula de unión al antígeno a un antígeno a pH 6,7 a pH 10,0;
- (b) permitir que la molécula de unión al antígeno unida al antígeno de (a) permanezca a pH 4,0 a pH 6,5;
- (c) recoger la molécula de unión al antígeno que se disoció a pH 4,0 a pH 6,5;
- (d) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno obtenida en (c); y
- (e) producir la molécula de unión al antígeno con el gen obtenido en (d).

Además, la presente descripción también proporciona métodos para producir moléculas de unión al antígeno, que comprenden las etapas de:

- (a) seleccionar una molécula de unión al antígeno que no se une al antígeno a pH 4,0 a pH 6,5;
- (b) unir el antígeno a pH 6,7 a pH 10,0 a la molécula de unión al antígeno que se selecciona en (a);
- 6.7 recoger la molécula de unión al antígeno que se unió al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0;
- (c) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno recogida en (c); y
- (d) producir la molécula de unión al antígeno con el gen obtenido en (d).

Además, la presente descripción proporciona métodos para producir moléculas de unión al antígeno, que comprenden las etapas de:

- (a) unir una molécula de unión al antígeno a un antígeno a pH 6,7 a pH 10,0;

- (b) permitir que la molécula de unión al antígeno que se unió al antígeno en (a) permanezca a pH 4,0 a pH 6,5;
- (c) recoger la molécula de unión al antígeno que se disoció a pH 4,0 a pH 6,5;
- (d) amplificar el gen que codifica la molécula de unión al antígeno disociada;
- (e) recoger la molécula de unión al antígeno eluida;
- 5 (f) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno recogida en (e); y
- (g) producir la molécula de unión al antígeno con el gen obtenido en (f).

Se pueden repetir las etapas (a) a (d) dos veces o más. Por lo tanto, la presente descripción proporciona los métodos que se describieron anteriormente que incluyen además la etapa de repetir las etapas (a) a (d) dos veces o más. La cantidad de veces que se pueden repetir las etapas (a) a (d) no se encuentra limitada de manera particular; sin embargo, generalmente es de diez veces o menos.

Además, la presente descripción proporciona métodos de selección de moléculas de unión al antígeno, que comprenden las etapas de:

- (a) seleccionar una molécula de unión al antígeno que no se une a un antígeno a pH 4,0 a pH 6,5;
- (b) unir el antígeno a pH 6,7 a pH 10,0 a la molécula de unión al antígeno que se selecciona en (a);
- 15 (c) recoger la molécula de unión al antígeno que se unió al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0;
- (d) amplificar el gen que codifica la molécula de unión al antígeno disociada;
- (e) recoger la molécula de unión al antígeno eluida;
- (f) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno recogida en (e); y
- (g) producir la molécula de unión al antígeno con el gene obtenido en (f).

20 Se pueden repetir las etapas (a) a (d) dos veces o más. Por lo tanto, la presente descripción proporciona los métodos que se describieron anteriormente, que incluyen además la etapa de repetir las etapas (a) a (d) dos veces o más. La cantidad de veces que se pueden repetir las etapas (a) a (d) no se encuentra limitada de manera particular; sin embargo, generalmente es de diez veces o menos.

Además, la presente descripción proporciona métodos para producir moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH sea superior a la actividad a un segundo pH, que comprenden las etapas de:

- (a) unir la molécula de unión al antígeno a una columna inmovilizada con antígeno a un primer pH;
- (b) eluir la molécula de unión al antígeno que se encuentra unida a la columna al primer pH de la columna a un segundo pH;
- (c) recoger la molécula de unión al antígeno eluida;
- 30 (d) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno recogida en (c); y
- (e) producir la molécula de unión al antígeno con el gen obtenido en (d).

Además, la presente descripción proporciona métodos para producir moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH sea superior a la actividad a un segundo pH, que comprenden las etapas de:

- (a) unir una genoteca de molécula de unión al antígeno a una columna inmovilizada con antígeno al primer pH;
- 35 (b) eluir la molécula de unión al antígeno de la columna al segundo pH;
- (c) amplificar el gen que codifica la molécula de unión al antígeno eluida;
- (d) recoger la molécula de unión al antígeno eluida;
- (e) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno recogida en (d); y
- (f) producir la molécula de unión al antígeno con el gen obtenido en (e).

Se pueden repetir las etapas (a) a (c) dos veces o más. Por lo tanto, la presente descripción proporciona los métodos que se describieron anteriormente, que comprenden además la etapa de repetir las etapas (a) a (c) dos veces o más. La cantidad de veces que se pueden repetir las etapas (a) a (c) no se encuentra limitada de manera particular; sin embargo, generalmente es de diez veces o menos.

- 5 Cuando se utiliza una genoteca de fagos en los métodos de producción que se describen en la presente, la etapa de amplificar el gen que codifica la molécula de unión al antígeno puede ser la etapa de amplificación de fagos.

Las sustancias de unión al antígeno que se utilizan en los métodos de producción que se describen en la presente se pueden preparar mediante cualquier método. Por ejemplo, es posible utilizar anticuerpos preexistentes, genotecas preexistentes (genotecas de fagos y similares), anticuerpos y genotecas que se preparan a partir de híbridos obtenidos mediante la inmunización de animales o a partir de linfocitos B de animales inmunizados, anticuerpos y genotecas (genotecas con alto contenido de histidina o un aminoácido no natural, genotecas introducidas con histidina o un aminoácido no natural en sitios específicos y similares) preparados mediante la introducción de mutaciones de histidina o mutaciones de aminoácidos no naturales en los anticuerpos y genotecas que se describieron anteriormente, etc.

15 En los métodos de producción que se describieron anteriormente, la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0 no se encuentra limitada de manera particular, en la medida en que la actividad de unión al antígeno sea una actividad de unión al antígeno a pH entre pH 6,7 y pH 10,0. Una actividad de unión al antígeno preferida es una actividad a pH entre pH 7,0 y pH 8,0 y una actividad de unión al antígeno más preferida es una actividad a pH 7,4. De manera alternativa, la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 4,0 a pH 6,5 no se encuentra limitada de manera particular, en la medida en que la actividad de unión al antígeno sea una actividad de unión al antígeno a pH entre pH 4,0 y pH 6,5. Una actividad de unión al antígeno preferida es una actividad a pH entre pH 5,5 y pH 6,5 y una actividad de unión al antígeno más preferida es una actividad a pH 5,8 o pH 5,5.

25 La actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno se puede determinar mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica pueden determinar de manera apropiada las condiciones distintas del pH.

La etapa de seleccionar las moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0 es superior a la actividad a pH 4,0 a pH 6,5 es sinónimo de la etapa de seleccionar las moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 4,0 a pH 6,5 es inferior a la actividad a pH 6,7 a pH 10,0.

30 La diferencia en la actividad de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0 y la actividad a pH 4,0 a pH 6,5 no se encuentra limitada de manera particular en la medida en que la actividad de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0 sea superior a la actividad a pH 4,0 a pH 6,5. La actividad de unión al antígeno a pH 6,7 a pH 10,0 es preferiblemente el doble o más, más preferiblemente diez veces o más, y aun más preferiblemente 40 veces o más que la actividad a pH 4,0 a pH 6,5.

35 En los métodos de producción que se describieron anteriormente, la molécula de unión al antígeno se puede unir al antígeno en cualquier condición, y la condición no se encuentra limitada de manera particular. Por ejemplo, la molécula de unión al antígeno se puede unir al antígeno al contactar el antígeno con la molécula de unión al antígeno inmovilizada, o al contactar la molécula de unión al antígeno con el antígeno inmovilizado. De manera alternativa, la molécula de unión al antígeno se puede unir al antígeno al contactar el antígeno y la molécula de unión al antígeno en una solución.

40 En los métodos de producción que se describieron anteriormente, cada uno del primer y segundo pH puede ser cualquier pH, en la medida en que no sean idénticos. En una combinación preferida del primer y segundo pH, por ejemplo, el primer pH es entre pH 6,7 y pH 10,0, y el segundo pH es entre pH 4,0 y pH 6,5; en una combinación más preferida, el primer pH es entre pH 7,0 y pH 8,0 y el segundo pH es entre pH 5,5 y pH 6,5; y en una combinación aun más preferida, el primer pH es pH 7,4 y el segundo pH es pH 5,8 o pH 5,5.

En otra combinación preferida del primer y segundo pH, por ejemplo, el primer pH es entre pH 4,0 y pH 6,5, y el segundo pH es entre pH 6,7 y pH 10,0; en una combinación más preferida, el primer pH es entre pH 5,5 y pH 6,5 y el segundo pH es entre pH 7,0 y pH 8,0; y en una combinación aun más preferida, el primer pH es pH 5,8 o pH 5,5 y el segundo pH es pH 7,4.

50 Las moléculas de unión al antígeno que se producen mediante los métodos de producción que se describieron anteriormente pueden ser cualquier molécula de unión al antígeno. Las moléculas de unión al antígeno preferidas incluyen, por ejemplo, moléculas de unión al antígeno en las que al menos un aminoácido se sustituye con histidina o se ha insertado al menos una histidina. El sitio en el que se introduce dicha mutación de histidina no se encuentra limitado de manera particular, y se puede introducir en cualquier sitio. Además, la mutación de histidina se puede introducir en un sitio o en dos o más sitios.

Por lo tanto, los métodos de producción que se describen en la presente pueden comprender además la etapa de sustituir al menos un aminoácido en una molécula de unión al antígeno con histidina, o insertar al menos una

histidina en las moléculas de unión al antígeno.

En los métodos de producción que se describen en la presente, se pueden utilizar aminoácidos no naturales en lugar de histidina. Por lo tanto, la presente descripción también se puede comprender reemplazando la histidina mencionada anteriormente con aminoácidos no naturales.

5 Además, en otra realización, las moléculas de unión al antígeno que se producen mediante los métodos de producción que se describieron anteriormente incluyen, por ejemplo, las moléculas de unión al antígeno que incluyen las regiones constantes de anticuerpo modificadas. Por consiguiente, los métodos de producción que se describen en la presente pueden comprender además la etapa de modificar los aminoácidos de regiones constantes del anticuerpo.

10 Las moléculas de unión al antígeno que se producen mediante los métodos de producción que se describen en la presente son superiores en la retención en plasma. Por lo tanto, los métodos de producción que se describen en la presente se pueden utilizar como métodos de producción de moléculas de unión al antígeno que sean superiores en la retención en plasma. ■

15 Además, se espera que las moléculas de unión al antígeno producidas mediante los métodos de producción puedan unirse a los antígenos dos veces o más cuando se administran a animales como humanos, ratones o monos. Por lo tanto, los métodos de producción que se describen en la presente se pueden utilizar como métodos de producción de moléculas de unión al antígeno que se puedan unir al antígeno dos veces o más.

20 Además, se espera que las moléculas de unión al antígeno producidas mediante los métodos de producción puedan unirse a más antígenos en comparación con la cantidad de sus sitios de unión al antígeno cuando se administran a animales como humanos, ratones o monos. Por lo tanto, los métodos de producción que se describen en la presente se pueden utilizar como métodos de producción de moléculas de unión al antígeno que puedan unirse a más antígenos en comparación con la cantidad de sus sitios de unión al antígeno.

25 Además, se espera que las moléculas de unión al antígeno producidas mediante los métodos de producción que se describen en la presente puedan disociarse dentro de una célula de un antígeno unido de manera extracelular cuando se administran a animales como humanos, ratones o monos. Por lo tanto, los métodos de producción que se describen en la presente se pueden utilizar como métodos de producción de moléculas de unión al antígeno que puedan disociarse dentro de una célula de un antígeno unido de manera extracelular.

30 Además, se espera que las moléculas de unión al antígeno producidas mediante los métodos de producción que se describen en la presente puedan unirse a un antígeno e internalizarse en una célula, así como liberarse al exterior de la célula de forma libre de antígeno, cuando se administran a animales como humanos, ratones o monos. Por lo tanto, los métodos de producción que se describen en la presente se pueden utilizar como métodos de producción de moléculas de unión al antígeno que puedan unirse a un antígeno e internalizarse en una célula y liberarse al exterior de la célula de forma libre del antígeno.

35 Además, se espera que las moléculas de unión al antígeno que se producen mediante los métodos de producción que se describen en la presente puedan eliminar de forma rápida los antígenos del plasma cuando se administran a animales como humanos, ratones o monos. Por lo tanto, los métodos de producción que se describen en la presente se pueden utilizar como un método para producir moléculas de unión al antígeno con una mayor (alta) capacidad para eliminar antígenos del plasma.

40 Además, dichas moléculas de unión al antígeno pueden reducir la cantidad de dosis en pacientes y se espera que sean particularmente superiores como agentes farmacéuticos. Por lo tanto, los métodos de producción que se describen en la presente se pueden utilizar como métodos de producción de moléculas de unión al antígeno para su uso como composiciones farmacéuticas.

45 Los genes obtenidos mediante los métodos de producción que se describen en la presente se realizan en general mediante (insertados en) vectores apropiados y luego se introducen en células hospedadoras. Los vectores no se encuentran limitados de manera particular en la medida en que retengan de forma estable los ácidos nucleicos insertados. Por ejemplo, cuando se utiliza *Escherichia coli* (*E. coli*) como hospedador, los vectores de clonación preferidos incluyen el vector pBluescript (Stratagene); sin embargo, se pueden utilizar varios vectores disponibles comercialmente. Al utilizar vectores para producir las moléculas de unión al antígeno que se describen en la presente, los vectores de expresión son particularmente útiles. Los vectores de expresión no se encuentran limitados de manera particular en la medida en que los vectores expresen las moléculas de unión al antígeno *in vitro* en *E. coli*, en células de cultivo, o en el cuerpo de un organismo. Por ejemplo, se prefiere el vector pBEST (Promega) para la expresión *in vitro*; se prefiere el vector pET (Invitrogen) para *E. coli.*, se prefiere el vector pME18S-FL3 (número de acceso GenBank AB009864) para las células de cultivo; y se prefiere el vector pMEISS (Mol Cell Biol. 8:466-472 (1988)) para cuerpos de organismos. Los ADN que se describen en la presente se pueden insertar en los vectores mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante ligación con sitios de enzima de restricción (Current protocols in Molecular Biology, edit. Ausubel *et al.*, (1987) Publish. John Wiley & Sons, Section 11.4-11.11).

55 Las células hospedadoras que anteceden no se encuentran limitadas de manera particular, y se pueden utilizar

- 5 varias células hospedadoras dependiendo del propósito. Los ejemplos de células para la expresión de las moléculas de unión al antígeno incluyen células bacterianas (como las de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Streptomyces* y *Bacillus subtilis*), células eucariotas (como las de levadura y *Aspergillus*), células de insecto (como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* SF9), células animales (como CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK293 y células de melanoma de Bowes) y células vegetales. Se pueden introducir vectores en una célula hospedadora mediante métodos conocidos, por ejemplo, métodos de precipitación de fosfato de calcio, métodos de electroporación (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel *et al.* (1987) Publish. John Wiley & Sons, Section 9.1-9.9), métodos de lipofección y métodos de microinyección.
- 10 Las células hospedadoras se pueden cultivar mediante métodos conocidos. Por ejemplo, al utilizar células animales como hospedador, se pueden utilizar DMEM, MEM, RPMI 1640 o IMDM como medio de cultivo.
- Estos se pueden utilizar con complementos de suero como FBS o suero fetal bovino (FCS). Las células se pueden cultivar en cultivos sin suero. El pH preferido es de aproximadamente 6 a 8 durante el transcurso del cultivo. En general, la incubación se realiza a 30 a 40 °C durante aproximadamente 15 a 200 horas. El medio se intercambia, airea o agita, según sea necesario.
- 15 Las señales de secreción apropiadas se pueden incorporar a los polipéptidos de interés de manera que las moléculas de unión al antígeno expresadas en la célula hospedadora se secreten en el lumen del retículo endoplásmico, en el espacio periplásmico o en el entorno extracelular. Estas señales pueden ser endógenas con respecto a las moléculas de unión al antígeno de interés o pueden ser señales heterólogas.
- 20 Por otro lado, por ejemplo, los sistemas de producción que utilizan animales o plantas se pueden utilizar como sistemas para producir polipéptidos *in vivo*. Se introduce un polinucleótido de interés en un animal o planta y el polipéptido se produce en el cuerpo del animal o planta y luego se recoge. Los "hospedadores" que se describen en la presente incluyen dichos animales y plantas.
- El sistema de producción que utiliza animales incluye los que utilizan mamíferos o insectos. Es posible utilizar mamíferos como cabras, cerdos, ovejas, ratones y bovinos (Vicki Glaser SPECTRUM Biotechnology Applications (1993)). Los mamíferos pueden ser animales transgénicos.
- 25 Por ejemplo, un polinucleótido que codifica una molécula de unión al antígeno que se describe en la presente se prepara como un gen de fusión con un gen que codifica un polipéptido que se produce específicamente en la leche, como la β -caseína de cabra. A continuación, los embriones de cabra se inyectan con fragmentos de polinucleótido que contienen el gen de fusión y luego se trasplantan a cabras hembra. Las moléculas de unión al antígeno deseadas se pueden obtener a partir de leche producida por las cabras transgénicas, que se obtienen de las cabras que recibieron los embriones o de sus crías. Las hormonas se pueden administrar según sea apropiado para aumentar el volumen de la leche que contiene la molécula de unión al antígeno producida por las cabras transgénicas (Ebert *et al.*, *Bio/Technology* (1994) 12: 699-702).
- 30 Se pueden utilizar insectos, como los gusanos de seda, para producir las moléculas de unión al antígeno que se describen en la presente. Cuando se utilizan gusanos de seda, se pueden utilizar baculovirus que contienen un polipéptido que codifica una molécula de unión al antígeno de interés para infectar los gusanos de seda y la molécula de unión al antígeno de interés se puede obtener de sus fluidos corporales.
- Además, cuando se utilizan plantas para producir las moléculas de unión al antígeno que se describen en la presente, por ejemplo, se puede utilizar tabaco. Cuando se utiliza tabaco, se inserta un polinucleótido que codifica una molécula de unión al antígeno de interés en un vector de expresión vegetal, por ejemplo, pMON 530, y luego el vector se introduce en las bacterias, como *Agrobacterium tumefaciens*. Luego se permite que las bacterias infecten tabaco como *Nicotiana tabacum*, y las moléculas de unión al antígeno deseadas se pueden recoger de sus hojas (Ma *et al.*, *Eur. J. Immunol.* (1994) 24: 131-138). De manera alternativa, es posible infectar lentejas de agua (*Lemna minor*) con bacterias similares. Después de la clonación, las moléculas de unión al antígeno deseadas se pueden obtener de las células de lentejas de agua (Cox KM *si al.*, *Nat. Biotechnol.* Diciembre 2006; 24(12): 1591-1597).
- 45 Las moléculas de unión al antígeno obtenidas de este modo se pueden aislar desde el interior o exterior (como el medio y la leche) de las células hospedadoras, y se pueden purificar como moléculas de unión al antígeno sustancialmente puras y homogéneas. Los métodos para aislar y purificar las moléculas de unión al antígeno no se encuentran limitados de manera particular y se pueden usar los métodos de aislamiento y purificación generalmente utilizados para la purificación de polipéptidos. Las moléculas de unión al antígeno se pueden aislar y purificar mediante la selección y combinación adecuada, por ejemplo, columnas cromatográficas, filtración, ultrafiltración, precipitación por sales, precipitación por disolvente, extracción por disolvente, destilado, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, enfoque isoeléctrico, diálisis y recristalización.
- 50 La cromatografía incluye, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbica, filtración en gel, cromatografía de fase inversa y cromatografía de adsorción (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak *et al.*, (1996) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Dichos métodos cromatográficos se pueden realizar utilizando cromatografía de fase líquida como HPLC y FPLC. Las columnas utilizadas para cromatografía de afinidad incluyen las columnas de
- 55

proteína A y las columnas de proteína G. Las columnas que utilizan la proteína A incluyen, por ejemplo, Hyper D, POROS y Sepharose F. F. (Farmacia).

- 5 Si fuera necesario, se puede modificar una molécula de unión al antígeno de manera arbitraria, y los péptidos se pueden eliminar de manera parcial permitiendo que una enzima de modificación de proteína apropiada actúe antes o después de la purificación de la molécula de unión al antígeno. Dichas enzimas de modificación de proteína incluyen, por ejemplo, tripsina, quimiotripsina, endopeptidasas de lisilo, proteína cinasas y glicosidasas.

Anticuerpos del receptor de anti-IL-6

Además, la presente descripción proporciona los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de (a) a (m) que figuran a continuación:

- 10 (a) un anticuerpo que incluye una región variable de cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos, en donde al menos uno de Tyr en la posición 27, Asp en la posición 31, Asp en la posición 32, Trp en la posición 35, Tyr en la posición 51, Asn en la posición 59, Ser en la posición 63, Met en la posición 106 y Tyr en la posición 108 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 (región variable de H53) se ha sustituido con His;
- 15 (b) un anticuerpo que incluye una región variable de cadena pesada (H3pl) con una secuencia de aminoácidos, en donde Tyr en la posición 27, Asp en la posición 31 y Trp en la posición 35 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ED NO: 1 (región variable de H53) se ha sustituido con His;
- 20 (c) un anticuerpo que incluye una región variable de cadena pesada con una secuencia de aminoácidos, en donde Tyr en la posición 27, Asp en la posición 31, Asp en la posición 32, Trp en la posición 35, Asn en la posición 59. Ser en la posición 63 y Tyr en la posición 108 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (región variable de H53) se ha sustituido con His;
- 25 (d) un anticuerpo que incluye una región variable de cadena pesada (HI 70) con una secuencia de aminoácidos, en donde Tyr en la posición 27, Asp en la posición 31, Asp en la posición 32, Trp en la posición 35, Asn en la posición 59, Ser en la posición 63 y Tyr en la posición 108 se han sustituido con His, y en donde Ser en la posición 99 se ha sustituido con Val y Thr en la posición 103 se ha sustituido con Ile en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (región variable de H53);
- 30 (e) un anticuerpo que incluye una región variable de cadena pesada con una secuencia de aminoácidos, en donde Asp en la posición 31, Tyr en la posición 51, Ser en la posición 63, Met en la posición 106 y Tyr en la posición 108 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ED NO: 1 (región variable de H53) se ha sustituido con His;
- 35 (f) un anticuerpo que incluye una región variable de cadena pesada (CLH5) con una secuencia de aminoácidos, en donde Asp en la posición 31, Tyr en la posición 51, Ser en la posición 63, Met en la posición 106 y Tyr en la posición 108 se han sustituido con His, y en donde Ser en la posición 99 se han sustituido con Phe y Thr en la posición 103 se han sustituido con Ile en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (región variable de H53);
- 40 (g) un anticuerpo que incluye una región variable de cadena ligera con una secuencia de aminoácidos, en donde al menos uno de Asp en la posición 28, Tyr en la posición 32, Glu en la posición 53, Ser en la posición 56 y Asn en la posición 92 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (región variable de PF1L) se han sustituido con His;
- 45 (h) un anticuerpo que incluye una región variable de cadena ligera (L73) con una secuencia de aminoácidos, en donde Asp en la posición 28, Tyr en la posición 32 y Glu en la posición 53 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (región variable de PF1L) se han sustituido con His;
- 50 (i) un anticuerpo que incluye una región variable de cadena ligera (L82) con una secuencia de aminoácidos, en donde Tyr en la posición 32 y Glu en la posición 53 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (región variable de H53) se ha sustituido con His;
- (j) un anticuerpo que incluye una región variable de cadena ligera (CLL5) con una secuencia de aminoácidos, en donde Tyr en la posición 32, Glu en la posición 53, Ser en la posición 56 y Asn en la posición 92 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (región variable de PF1L) se han sustituido con His;
- (k) un anticuerpo que incluye la región variable de cadena pesada de (b) y la región variable de cadena ligera de (h);
- (l) un anticuerpo que incluye la región variable de cadena pesada de (d) y la región variable de cadena ligera de (i); y
- (m) un anticuerpo que incluye la región variable de cadena pesada de (f) y la región variable de cadena ligera

de (h).

5 Los ejemplos específicos de la región variable de cadena pesada con una secuencia de aminoácidos en donde al menos uno de Tyr en la posición 27, Asp en la posición 31, Asp en la posición 32, Trp en la posición 35, Tyr en la posición 51, Asn en la posición 59, Ser en la posición 63, Met en la posición 106 y Tyr en la posición 108 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (región variable de H53) se han sustituido con His incluyen, por ejemplo, las siguientes regiones variables de cadena pesada.

una región variable de cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 (H3pl)

una región variable de cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 (H170)

una región variable de cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 (CLH5)

10 Los ejemplos específicos de la región variable de cadena ligera con una secuencia de aminoácidos, en donde al menos uno de Asp en la posición 28, Tyr en la posición 32, Glu en la posición 53, Ser en la posición 56 y Asn en la posición 92 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 (región variable de PF1L) se han sustituido con His incluyen, por ejemplo, las siguientes regiones variables de cadena ligera.

una región variable de cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 (L73)

15 una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 (L82)

una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 (CLL5)

Las posiciones y sustituciones de aminoácidos en cada uno de los anticuerpos que se describieron anteriormente H3pl, H170, CLH5, L73, L82 y CLL5 se muestran a continuación en la Tabla 1. Las posiciones de aminoácidos se muestran en función de la numeración de Kabat.

20 Tabla 1

posición	27	31	32	33	35	50	58	61	62	63	64	65	95	99	100B	102
H3pl	H	H		H	H											
H170	H	H	H	H	H		H		H				V	I		H
CLH5		H		H		H			H				F	I	H	H

posición	24	27	28	32	53	55	56	90	92	94
L73			H	H	H	H				
LB2				H	H	H				
CLL5				H	H	H	H		H	

* En WT, la cadena H tiene histidina en la posición 33, mientras que la cadena L tiene histidina en la posición 55.

25 La presente descripción proporciona anticuerpos que comprenden al menos cualquiera de las sustituciones de aminoácidos que se describieron anteriormente en (a) a (j) y métodos de producción de anticuerpos. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente descripción también incluyen anticuerpos que comprenden no solamente cualquiera de las sustituciones de aminoácidos que se describieron anteriormente en (a) a (j) sino también las sustituciones de aminoácidos distintas de las que se describieron anteriormente en (a) a (j). Las sustituciones de aminoácidos distintas de las que se describieron anteriormente en (a) a (j) incluyen, por ejemplo, la sustitución, eliminación, adición y/o inserción en la secuencia de aminoácidos de las CDR y FR.

30 Además, la presente descripción proporciona los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de (1) a (28) que figuran a continuación:

(1) un anticuerpo que incluye la región variable de cadena pesada (región variable de VH1-IgG1) con la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 119 en la SEQ ID NO: 21 (VH1-IgG1);

(2) un anticuerpo que incluye la región variable de cadena pesada (región variable de VH2-IgG1) con la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 119 en la SEQ ID NO: 22 (VH2-IgG1);

35 (3) un anticuerpo que incluye la región variable de cadena pesada (región variable de VH3-IgG1) con la

- secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 119 en la SEQ ID NO: 23 (VH3-IgG1);
- (4) un anticuerpo que incluye la región variable de cadena pesada (región variable de VH4-IgG1) con la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 119 en la SEQ ID NO: 24 (VH4-IgG1);
- 5 (5) un anticuerpo que incluye la región variable de cadena ligera (región variable de VL1-CK) con la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 107 en la SEQ ID NO: 25 (VL1-CK);
- (6) un anticuerpo que incluye la región variable de cadena ligera (región variable de VL2-CK) con la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 107 en la SEQ ID NO: 26 (VL2-CK);
- (7) un anticuerpo que incluye la región variable de cadena ligera (región variable de VL3-CK) con la secuencia de aminoácidos de las posiciones 1 a 107 en la SEQ ID NO: 27 (VL3-CK);
- 10 (8) un anticuerpo (Fv1-IgG1) que incluye la región variable de cadena pesada de (2) y la región variable de cadena ligera de (6);
- (9) un anticuerpo (Fv2-IgG1) que incluye la región variable de cadena pesada de (1) y una región variable de cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (L82);
- 15 (10) un anticuerpo (Fv3-IgG1) que incluye la región variable de cadena pesada de (4) y la región variable de cadena ligera de (5);
- (11) un anticuerpo (Fv4-IgG1) que incluye la región variable de cadena pesada de (3) y la región variable de cadena ligera de (7);
- (12) un anticuerpo (VH3-IgG2ΔGK) que incluye una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33;
- 20 (13) un anticuerpo (VH3-M58) que incluye una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 34;
- (14) un anticuerpo (VH3-M73) que incluye una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 35;
- 25 (15) un anticuerpo (Fv4-IgG2ΔGK) que incluye la cadena pesada de (12) y una cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 (VL3-CK);
- (16) un anticuerpo (Fv4-M58) que incluye la cadena pesada de (13) y una cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 (VL3-CK);
- (17) un anticuerpo (Fv4-M73) que incluye la cadena pesada de (14) y una cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 (VL3-CK);
- 30 (18) un anticuerpo (VH2-M71) que incluye una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 (VH2-M71);
- (19) un anticuerpo (VH2-M73) que incluye una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37 (VH2-M73);
- 35 (20) un anticuerpo (VH4-M71) que incluye una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38 (VH4-M71);
- (21) un anticuerpo (VH4-M73) que incluye una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 39 (VH4-M73);
- (22) un anticuerpo (Fv1-M71) que incluye la cadena pesada de (18) y una cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 (VL2-CK);
- 40 (23) un anticuerpo (Fv1-M73) que incluye la cadena pesada de (19) y una cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 (VL2-CK);
- (24) un anticuerpo (Fv3-M71) que incluye la cadena pesada de (20) y una cadena ligera con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 (VL1-CK);
- (25) un anticuerpo (Fv3-M73) que incluye la cadena pesada de (21) y una cadena ligera con la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 (VL1-CK);

(26) un anticuerpo que incluye una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 (VL1-CK);

5 (27) un anticuerpo que incluye una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 26 (VL2-CK); y

(28) un anticuerpo que incluye una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 27 (VL3-CK).

Además, la presente invención proporciona las FR y CDR de (a) a (v) que figuran a continuación:

- (a) la cadena pesada CDR1 de la SEQ ID NO: 40 (VH1, 2, 3, 4);
- 10 (b) la cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 41 (VH1, 2);
- (c) la cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 42 (VH3);
- (d) la cadena pesada CDR2 de la SEQ ID NO: 43 (VH4);
- (e) la cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 44 (VH1, 2);
- (f) la cadena pesada CDR3 de la SEQ ID NO: 45 (VH3, 4);
- 15 (g) la cadena pesada FR1 de la SEQ ID NO: 46 (VH1, 2);
- (h) la cadena pesada FR1 de la SEQ ID NO: 47 (VH3,4);
- (i) la cadena pesada FR2 de la SEQ ID NO: 48 (VH1, 2, 3, 4);
- (j) la cadena pesada FR3 de la SEQ ID NO: 49(VH1);
- (k) la cadena pesada FR3 de la SEQ ID NO: 50 (VH2);
- 20 (l) la cadena pesada FR3 de la SEQ ID NO: 51 (VH3, 4);
- (m) la cadena pesada FR4 de la SEQ ID NO: 52 (VH1, 2, 3, 4);
- (n) la cadena ligera CDR1 de la SEQ ID NO: 53 (VL1, 2);
- (o) la cadena ligera CDR1 de la SEQ ID NO: 54 (VL3);
- (p) la cadena ligera CDR2 de la SEQ ID NO: 55 (VL1, VL3);
- 25 (q) la cadena ligera CDR2 de la SEQ ID NO: 56 (VL2);
- (r) la cadena ligera CDR3 de la SEQ ID NO: 57 (VL1, 2, 3);
- (s) la cadena ligera FR1 de la SEQ ID NO: 58 (VL1, 2, 3);
- (t) la cadena ligera FR2 de la SEQ ID NO: 59 (VL1, 2, 3);
- (u) la cadena ligera FR3 de la SEQ ID NO: 60 (VL1,2, 3); y
- 30 (v) la cadena ligera FR4 de la SEQ ID NO: 61 (VL1, 2, 3).

Las secuencias respectivas de (a) a (v) que anteceden se muestran en la Figura 25. Además, la presente descripción proporciona polipéptidos que incluyen cualquiera de FR y CDR de (a) a (v) que anteceden.

35 Los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de la presente descripción también incluyen fragmentos y productos modificados de anticuerpos que incluyen cualquiera de las sustituciones de aminoácidos que se describieron anteriormente. Dichos fragmentos de anticuerpo incluyen, por ejemplo, Fab, F(ab')₂, Fv, Fv de cadena simple (scFv) en donde Fv de cadenas H y L se unen mediante un enlazador apropiado, la cadena H de dominio simple y la cadena L de dominio simple (por ejemplo, Nat. Biotechnol. Septiembre 2005:23(9): 1126-36), Unibody (WO 2007059782 A1) y SMIP (WO 2007014278 A2). El origen de los anticuerpos no se limita de manera particular. Los anticuerpos incluyen anticuerpos de humano, ratón, rata y conejo. Los anticuerpos de la presente invención también

pueden ser anticuerpos quiméricos, humanizados, humanizados completos o similares.

De manera específica, dichos fragmentos de anticuerpo se obtienen mediante el tratamiento de anticuerpos con enzimas, por ejemplo, papaína o pepsina, o mediante la construcción de genes que codifican dichos fragmentos de anticuerpo, insertándolos en vectores de expresión y luego expresándolos en células hospedadoras apropiadas (ver, por ejemplo, Co, M.S. *et al.*, J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496; Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-66; Bird, R. E. *et al.*, TTBTECH (1991)9,132-137).

La presente descripción proporciona métodos para producir (i) un polipéptido que se describe en la presente o (ii) un polipéptido codificado por un gen que codifica el polipéptido de la presente invención, en donde los métodos comprenden la etapa de cultivar una célula hospedadora que comprende un vector en el que se introduce un polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención.

De manera más específica, la presente descripción proporciona métodos de producción de un polipéptido que se describe en la presente, que comprenden las etapas de:

(a) cultivar una célula hospedadora que comprende un vector en el que se introduce un gen que codifica el polipéptido de la presente invención; y

(b) obtener el polipéptido codificado por el gen.

Se obtiene scFv mediante la unión de las regiones V de las cadenas H y L de anticuerpo. En dicho scFv, la región V de cadena H se une a la región V de cadena L mediante un enlazador, preferiblemente un enlazador peptídico (Huston, J. S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 10.0, 5879-5883). Las regiones V de cadena H y de cadena L en un scFv se pueden derivar de cualquier anticuerpo descrito anteriormente. El enlazador peptídico para enlazar las regiones V incluye, por ejemplo, péptidos de cadena simple arbitrarios de 12 a 19 residuos de aminoácidos.

Cuando un anticuerpo del receptor de anti-IL-6 de la presente descripción incluye una región constante, la región constante puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, se pueden usar IgG1, IgG2 o IgG4. La región constante es preferiblemente una región constante de anticuerpo humano. De manera alternativa, la región constante puede ser una forma modificada que incluye sustitución, eliminación, adición y/o inserción en la secuencia de aminoácidos de las regiones constantes de IgG1 humana, IgG2 humana o IgG4 humana.

El receptor de IL-6 preferido al que se une un anticuerpo del receptor de anti-IL-6 de la presente descripción es el receptor de IL-6 humano.

Los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de la presente invención son superiores en la retención en plasma y existen durante un periodo prolongado en el plasma de forma que puedan unirse al antígeno, es decir, receptores de IL-6 asociados a la membrana o solubles. Por lo tanto, los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 se unen *in vivo* a receptores de IL-6 asociados a la membrana o solubles durante un periodo prolongado. Además, los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 pueden unirse a los receptores de IL-6 dos veces o más y, por lo tanto, se supone que pueden neutralizar tres o más receptores de IL-6.

Composiciones farmacéuticas

La presente descripción también se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen moléculas de unión al antígeno de la presente invención, moléculas de unión al antígeno aisladas mediante métodos de selección de la presente invención, o moléculas de unión al antígeno producidas mediante los métodos de producción de la presente invención. Las moléculas de unión al antígeno que se describen en la presente y las moléculas de unión al antígeno producidas mediante los métodos de producción que se describen en la presente son superiores en la retención en plasma y, por lo tanto, se espera que reduzcan la frecuencia de administración de las moléculas de unión al antígeno y, por lo tanto, son útiles como composiciones farmacéuticas. La composición farmacéutica que se describe en la presente puede incluir portadores farmacéuticamente aceptables.

En la presente descripción, las composiciones farmacéuticas se refieren en general a agentes para tratar o prevenir o analizar y diagnosticar enfermedades.

Las composiciones farmacéuticas que se describen en la presente se pueden formular mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar de manera parenteral, en forma de inyecciones de soluciones o suspensiones estériles que incluyen agua u otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, dichas composiciones se pueden formular mediante la mezcla en forma de dosis unitaria necesaria en la práctica de fabricación de medicinas generalmente aprobada mediante la combinación apropiada con portadores o medios farmacéuticamente aceptables, específicamente con agua estéril, solución salina fisiológica, aceite vegetal, emulsionante, suspensión, tensioactivo, estabilizante, agente saborizante, excipiente, vehículo, conservante, aglutinante o similares. En dichas formulaciones, la cantidad de ingrediente activo se ajusta para obtener una cantidad apropiada en un intervalo predeterminado.

Las composiciones estériles para inyección se pueden formular usando vehículos como agua destilada para inyección, de acuerdo con la práctica de formulación estándar.

5 Las soluciones acuosas para inyección incluyen, por ejemplo, solución salina fisiológica y soluciones isotónicas que contienen dextrosa u otros adyuvantes (por ejemplo, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro de sodio). También es posible utilizar en combinación solubilizantes apropiados, por ejemplo, alcoholes (etanol y similares), polialcoholes (propilenglicol, polietilenglicol y similares), tensioactivos no iónicos (polisorbato 80(TM), HCO-50 y similares).

10 Los aceites incluyen aceite de sésamo y aceites de soja. Se pueden usar benzoato de bencilo y/o alcohol bencílico combinados como solubilizantes. También es posible combinar amortiguadores (por ejemplo, amortiguador de fosfato y amortiguador de acetato de sodio), agentes suavizantes (por ejemplo, clorhidrato de procaína), estabilizantes (por ejemplo, alcohol bencílico y fenol) y/o antioxidantes. Se rellenan las ampollas apropiadas con las inyecciones preparadas.

15 Las composiciones farmacéuticas que se describen en la presente se administran preferiblemente por vía parenteral. Por ejemplo, las composiciones pueden encontrarse en forma de dosificación para inyecciones, administración intranasal, administración transpulmonar o administración transdérmica. Por ejemplo, se pueden administrar por vía sistémica o local mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea o similares.

20 Los métodos de administración se pueden seleccionar de manera apropiada según la edad y los síntomas del paciente. La dosis de una composición farmacéutica que contiene una molécula de unión al antígeno puede ser, por ejemplo, de 0,0001 a 1000 mg/kg para cada administración.

De manera alternativa, la dosis puede ser, por ejemplo, 0,001 a 100.000 mg por paciente. Sin embargo, la presente invención no se limita a los valores numéricos que se describieron anteriormente. Las dosis y métodos de administración varían según el peso, edad, síntomas y similares del paciente.

25 Los expertos en la técnica pueden establecer dosis y métodos de administración apropiados según los factores que se describieron anteriormente.

30 Los aminoácidos contenidos en las secuencias de aminoácidos que se describen en la presente se pueden modificar de manera postraducciona. Por ejemplo, la modificación de un residuo de glutamina (Gln) de extremo N en un residuo de ácido piroglutámico (pGlu) mediante piroglutamilación es conocida por los expertos en la técnica. Naturalmente, dichos aminoácidos modificados de manera postraducciona se incluyen en las secuencias de aminoácidos que se describen en la presente.

Ejemplos

[Ejemplo 1] Producción de anticuerpo PM1 humanizado modificado Preparación de receptor de IL-6 humano soluble recombinante (SR344)

35 Se preparó un receptor de IL-6 humano recombinante del receptor de IL-6 humano, que sirvió como antígeno, como se describe a continuación. Se produjo una línea celular CHO que expresa de manera constante un receptor de IL-6 humano soluble (denominado en lo sucesivo SR344) (Yamasaki, et al., Science 1988; 241: 825-828 (GenBank #X12830)) que consiste en la secuencia de aminoácidos del primer aminoácido al aminoácido 344 en el lado de extremo N, según se indica en J. Biochem., 108, 673-676 (1990).

40 Se purificó SR344 a partir del sobrenadante de cultivo obtenido de las células CHO que expresan SR344 usando tres cromatografías de columna: Columna de cromatografía Blue Sepharose 6 FF, cromatografía de afinidad usando una columna en la que se inmovilizó un anticuerpo específico para SR344, y cromatografía de columna de filtración en gel. La fracción que se eluyó como el pico principal se utilizó como el producto purificado final.

Preparación de receptor de IL-6 soluble de mono cynomolgus recombinante (cIL-6R)

45 Se produjeron cebadores ADN oligo Rhe6Rf1 (SEQ ID NO: 16) y Rhe6Rr2 (SEQ ID NO: 17) en la secuencia génica del receptor de IL-6 de mono rhesus disponible públicamente (Birney et al., Ensemble 2006, Nucleic Acids Res., 1 enero 2006; 34 (publicación de base de datos): D556-61). Usando un ADNc preparado a partir de páncreas de cynomolgus como plantilla, se preparó un fragmento de ADN que codifica toda la longitud del gen de receptor de IL-6 de mono cynomolgus mediante PCR usando los cebadores Rhe6Rf1 y Rhe6Rr2. Usando el fragmento de ADN resultante como plantilla, un fragmento de ADN de 1131 pb (SEQ ID NO: 20) que codifica una proteína en la que se agrega 6xHis al extremo C de la región soluble (Met1-Pro363) que contiene una región señal del gen receptor de IL-6 de mono cynomolgus, se amplificó mediante PCR usando los cebadores de ADN oligo CynoIL6R N-EcoRI (SEQ ID NO: 18) y CynoIL6R C-NotI-His (SEQ ID NO: 19). El fragmento de ADN resultante se digirió con EcoRI y NotI y se insertó en un vector de expresión celular de mamífero, y esto luego se usó para producir una línea CHO de expresión estable (células CHO que producen cyno.sIL-6R).

Se purificó un medio de cultivo de células CHO que producen cyno.sIL-6R con una columna HisTrap (GE Healthcare Biosciences), concentrada usando Amicon Ultra-15 Ultracel-IoK (Millipore), y se purificó adicionalmente con una columna de filtración en gel Superdex 200 pg 16/60 (GE Healthcare Biosciences) para obtener el producto purificado final del receptor de IL-6 de mono cynomolgus soluble (denominado en lo sucesivo cIL-6R).

5 Preparación de IL-6 de mono cynomolgus recombinante (cIL6)

Se preparó IL-6 de mono cynomolgus de la siguiente manera. Se produjo una secuencia de nucleótidos que codifica los 212 aminoácidos registrados con el número de acceso SWISSPROT P79341, se clonó en un vector de expresión celular de mamífero y se introdujo en células CHO para producir una línea celular de expresión estable (células CHO que producen cyno.IL-6). Se purificó un medio de cultivo de células CHO que producen cyno.IL-6 con una columna SP-Sepharose/FF (GE Healthcare Biosciences), se concentró usando Amicon Ultra-15 Ultracel-5k (Millipore), y luego se purificó adicionalmente con una columna de filtración en gel Superdex 75 pg 26/60 (GE Healthcare Biosciences). Esto se concentró usando Amicon Ultra-15 Ultracel-5k (Millipore) para obtener un producto purificado final de IL-6 de mono cynomolgus (denominado en lo sucesivo cIL-6).

Establecimiento de la línea celular BaF3 que expresa gp130 humano

15 Se estableció una línea celular BaF3 que expresa gp130 humano según se indica a continuación para obtener una línea celular que presenta crecimiento dependiente de IL-6.

Se amplificó ADNc de gp130 humano de longitud completa (Hibi et al., Cell 1990; 63: 1149-1157 (GenBank #NM_002184)) mediante PCR y se clonó en el vector de expresión pCOS2Zeo, que se preparó retirando el sitio de expresión génica de DHFR de pCHOI (Hirata, et al., FEBS Letter 1994; 356: 244-248) e insertando un sitio de expresión génica de resistencia de Zeocina, para construir pCOS2Zeo/gp130. Se amplificó ADNc de IL-6R humano de longitud completa mediante PCR y se clonó en pcDNA3.1(+) (Invitrogen) para construir hIL-6R/pcDNA3.1(+). Se mezclaron 10 µg de pCOS2Zeo/gp130 en células BaF3 (0,8 x 10⁷ células) suspendidas en PBS, y se pulsaron usando Gene Pulser (Bio-Rad) a un voltaje de 0,33 kV y capacitancia de 950 µFD. Se cultivaron células BaF3 que se sometieron a introducción de genes mediante tratamiento de electroporación un día y noche enteros en medio RPMI1640 (Invitrogen) con 0,2 ng/mL de interleucina-3 de ratón (PeproTech) y suero fetal bovino al 10 % (denominado en lo sucesivo FBS, HyClone), y luego se analizaron agregando medio RPMI1640 con 100 ng/mL de interleucina-6 humana (R&D Systems), 100 ng/mL de receptor de interleucina-6 humano soluble (R&D Systems) y FBS al 10 % para establecer la línea celular BaF3 que expresa gp130 humana (denominada en lo sucesivo BaF3/gp130). Dado que esta BaF3/gp130 prolifera en presencia de interleucina-6 humana (R&D Systems) y SR344, se puede utilizar para evaluar la actividad inhibitoria del crecimiento (a saber, actividad de neutralización del receptor de IL-6) del anticuerpo del receptor de anti-IL-6.

Producción de anticuerpo del receptor de Anti-IL-6 humanizado

En el contexto del ejemplo presente y en cualquier otra parte en la presente, la expresión "tipo silvestre" se abrevia como WT, la expresión "cadena H de tipo silvestre" se abrevia como H(WT) (secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9) y la expresión "cadena L de tipo silvestre" se abrevia como L(WT) (secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10). En este contexto, se introdujeron mutaciones en la secuencia marco y secuencia de CDR de anticuerpo PM1 de ratón humanizado Cancer Res. 15 febrero 1993; 53(4): 851-6, para producir las cadenas H modificadas H53 (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 1) y F1H (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 11) y cadenas L modificadas L28 (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 12) y PF1L (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 2). Más específicamente, se produjeron mutantes usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene) de acuerdo con el método descrito en las instrucciones proporcionadas, y se insertaron los fragmentos de plásmido resultantes en un vector de expresión celular de mamífero para producir los vectores de expresión de cadena H y los vectores de expresión de cadena L deseados. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de los vectores de expresión obtenidos usando las metodologías convencionales conocidas por las personas expertas en la técnica.

Expresión y purificación de anticuerpo del receptor de Anti-IL-6 humanizado

Los anticuerpos se expresaron mediante el método que se describe a continuación. Se suspendió la línea celular HEK293H derivada de cáncer de riñón embrionario humano (Invitrogen) en DMEM (Invitrogen) complementado con suero fetal bovino al 10 % (Invitrogen). Las células se colocaron en placas a 10 ml por pocillo en pocillos para células adherentes (10 cm de diámetro; CORNING) a una densidad celular de 5 a 6 x 10⁵ células/ml y se cultivaron en una incubadora de CO₂ (37 °C, CO₂ al 5 %) durante un día y noche enteros. Luego, el medio se retiró mediante aspiración y se agregaron 6,9 ml de medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen). El plásmido preparado se introdujo en las células mediante el método de lipofección. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo resultantes, se centrifugaron (aproximadamente 2000 g, 5 min, temperatura ambiente) para retirar las células y se esterilizaron mediante filtración a través de un filtro de 0,22-µm MILLEX®-GV (Millipore) para obtener los sobrenadantes. Los anticuerpos se purificaron de los sobrenadantes de cultivo obtenidos mediante un método conocido por los expertos en la técnica usando rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences). Para determinar la concentración del anticuerpo purificado, se midió la absorbancia a 280 nm usando un espectrofotómetro. Se calcularon las concentraciones de

anticuerpo a partir de los valores determinados usando un coeficiente de absorbancia calculado mediante el método PACE (Protein Science 1995; 4:2411-2423).

[Ejemplo 2] Producción de anticuerpo de unión dependiente del pH H3pl/L73

Método para crear un anticuerpo que pueda neutralizar un antígeno varias veces

5 Dado que las moléculas de IgG son divalentes, una única molécula de IgG puede neutralizar hasta dos moléculas de antígeno cuando los dos sitios se unen a los antígenos; sin embargo, no puede neutralizar tres o más moléculas de antígeno. Por lo tanto, para mantener el efecto de neutralización de un anticuerpo de neutralización durante un periodo determinado, es necesario administrar una cantidad del anticuerpo que sea igual o superior a la cantidad de antígeno producido durante el periodo. Por lo tanto, existe una limitación en cuanto al grado hasta el que se puede reducir la dosis de anticuerpo necesaria al mejorar la farmacocinética o afinidad del anticuerpo. Por lo tanto, si fuera posible neutralizar dos o más moléculas de antígeno con una única molécula de IgG, la misma dosis podría mejorar la duración del efecto de neutralización o, de manera alternativa, se podría reducir la dosis de anticuerpo necesaria para alcanzar la misma duración.

15 Para los anticuerpos de neutralización, existen dos tipos de antígenos diana: antígenos tipo solubles, que se encuentran presentes en plasma, y antígenos unidos a la membrana, que se expresan en la superficie de las células.

20 Cuando el antígeno es un antígeno unido a la membrana, un anticuerpo administrado se une al antígeno de membrana en la superficie celular, y posteriormente el anticuerpo se absorbe en endosomas dentro de la célula mediante internalización junto con el antígeno de membrana unido al anticuerpo. Luego, el anticuerpo que se mantiene unido al antígeno se mueve a un lisosoma en donde se degrada mediante el lisosoma junto con el antígeno. La eliminación del anticuerpo del plasma, mediada por internalización mediante el antígeno de membrana, se denomina eliminación dependiente del antígeno, y esto se ha registrado para varias moléculas de anticuerpo (Drug Discov. Today, enero 2006; 11(1-2): 81-8). Dado que una única molécula de anticuerpo IgG se une a dos moléculas de antígeno cuando se une de manera divalente a los antígenos, y luego se internaliza y degrada directamente mediante el lisosoma, un único anticuerpo de IgG común no puede neutralizar dos o más moléculas de antígeno (Fig. 1).

30 El motivo de la retención prolongada (eliminación lenta) de las moléculas de IgG en plasma es que FcRn, conocido como receptor de rescate de molécula de IgG, funciona (Nat. Rev. Immunol. Septiembre 2007; 7(9): 715-25). Las moléculas de IgG que se han absorbido en endosomas mediante pinocitosis se unen a FcRn expresado en endosomas en condiciones ácidas intraendosómicas. Las moléculas de IgG unidas a FcRn se mueven hacia la superficie celular en donde se disocian de FcRn en condiciones neutras en el plasma y regresan al plasma, mientras que las moléculas de IgG que no pueden unirse a FcRn continúan hacia los lisosomas en donde se degradan (Fig. 2).

35 Las moléculas de IgG unidas a un antígeno de membrana se absorben en endosomas intracelulares mediante internalización, mueven hacia lisosomas mientras se encuentran unidas al antígeno y experimentan degradación. Cuando un anticuerpo de IgG se une de manera divalente a los antígenos, neutraliza dos moléculas de antígeno y experimenta degradación junto con los antígenos. En caso de que el anticuerpo de IgG, cuando se absorbe en endosomas intracelulares mediante internalización, pueda disociarse del antígeno en condiciones ácidas intraendosómicas, el anticuerpo disociado puede unirse a FcRn expresado en los endosomas. La molécula de IgG disociada del antígeno y unida a FcRn se transfiere a la superficie celular y luego se disocia de FcRn en condiciones neutras en el plasma, regresan así nuevamente al plasma. La molécula de IgG que ha vuelto al plasma puede unirse a un nuevo antígeno de membrana nuevamente. La repetición de este proceso permite que una única molécula de IgG se una de forma reiterada a los antígenos de membrana, lo que permite la neutralización de varios antígenos con una única molécula de IgG (Fig. 3).

45 En el caso de un antígeno soluble, un anticuerpo administrado se une al antígeno en el plasma, y permanece en el plasma en forma de un complejo antígeno-anticuerpo. Normalmente, mientras que la retención del anticuerpo en plasma es muy prolongada (la velocidad de eliminación es muy lenta) debido a la función de FcRn como se describió anteriormente, la retención del antígeno en plasma es breve (la velocidad de eliminación es rápida). Por lo tanto, los antígenos unidos al anticuerpo muestran retención en plasma comparable a la retención del anticuerpo (la velocidad de eliminación es muy lenta). Los antígenos se producen en el cuerpo a velocidad constante y, en ausencia del anticuerpo, se presentan en el plasma a una concentración a la cual la velocidad de producción del antígeno y la velocidad de eliminación del antígeno tienen un equilibrio. En presencia de anticuerpo, la mayor parte de los antígenos se unen a los anticuerpos, lo que genera la eliminación muy lenta de antígenos. Por lo tanto, la concentración de antígeno en plasma aumenta en comparación con la concentración en ausencia de anticuerpo (Kidney Int. 2003, 64, 697-703; J. National Cancer Institute 2002, 94(19), 1484-1493; J. Allergy and Clinical Immunology 1997, 100(1), 110-121; Eur. J. Immunol. 1993, 23; 2026-2029). Incluso si la afinidad del anticuerpo con el antígeno es infinita, la concentración del antígeno se eleva a medida que el anticuerpo se elimina lentamente del plasma, y el efecto de neutralización del anticuerpo termina una vez que las concentraciones del anticuerpo y el antígeno se vuelven iguales. Si bien los anticuerpos con una mayor constante de disociación (KD) pueden

neutralizar antígenos solubles a menor concentración de anticuerpo, los anticuerpos a la mitad de concentración o menos en comparación con la concentración del antígeno presente no pueden neutralizar los antígenos, independientemente de cuán fuerte sea la afinidad del anticuerpo (Biochem. Biophys. Res. Commun. 9 septiembre 2005; 334(4): 1004-13). Como en el caso de las moléculas de IgG que no se unen a los antígenos, las moléculas de IgG unidas a los antígenos en el plasma también se absorben en endosomas mediante pinocitosis, y se unen a FcRn expresado en endosomas en condiciones ácidas intraendosómicas. Las moléculas de IgG que se unen a FcRn se mueven hacia la superficie celular mientras que el anticuerpo se mantiene unido al antígeno y luego se disocia del FcRn en condiciones neutras en el plasma. Dado que las moléculas de IgG regresan al plasma mientras están unidas al antígeno, no pueden unirse a nuevos antígenos en el plasma. En este caso, si las moléculas de IgG se pueden disociar del antígeno en condiciones ácidas intraendosómicas, el antígeno disociado no podrá unirse a FcRn y así se puede degradar mediante lisosomas. Por otra parte, las moléculas de IgG pueden volver al plasma nuevamente mediante la unión a FcRn. Dado que las moléculas de IgG que han vuelto al plasma ya se han disociado del antígeno en endosomas, pueden unirse a un nuevo antígeno nuevamente en el plasma. La repetición de este proceso permite que una única molécula de IgG se una de forma reiterada a antígenos solubles. Esto permite que una única molécula de IgG neutralice varios antígenos (Fig. 4).

Por lo tanto, independientemente de si el antígeno es un antígeno de membrana o un antígeno soluble, si la disociación del anticuerpo de IgG del antígeno es posible en condiciones ácidas intraendosómicas, una única molécula de IgG podrá neutralizar de forma reiterada los antígenos. A los efectos de que los anticuerpos de IgG se disocian de los antígenos en condiciones ácidas intraendosómicas, es necesario que la unión entre antígeno y anticuerpo sea considerablemente más débil en condiciones ácidas que en condiciones neutras. Dado que los antígenos de membrana en la superficie celular se deben neutralizar, los anticuerpos se deben unir firmemente a los antígenos a pH de la superficie celular, a saber, pH 7,4. Dado que se ha registrado que el pH intraendosómico sea comúnmente pH 5,5 a 6,0 (Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. Febrero 2004; 5(2): 121-32), se considera que un anticuerpo que se une de forma débil a un antígeno a pH 5,5 a 6,0 se disocia del antígeno en condiciones ácidas intraendosómicas. De manera más específica, una única molécula de IgG que se une firmemente a un anticuerpo a pH de la superficie celular de 7,4 y se une de forma débil al antígeno al pH intraendosómico de 5,5 a 6,0 puede neutralizar varios antígenos y mejorar así la farmacocinética.

En general, las interacciones entre proteínas consisten en interacción hidrofóbica, interacción electrostática y unión a hidrógeno, y la fuerza de unión se expresa generalmente como una constante de unión (afinidad) o constante de unión evidente (avidez). La unión dependiente del pH, cuya fuerza de unión varía entre condiciones neutras (pH 7,4) y condiciones ácidas (pH 5,5 a 6,0), está presente en las interacciones entre proteínas de origen natural. Por ejemplo, la unión mencionada anteriormente entre las moléculas de IgG y FcRn conocidas como receptor de rescate para moléculas de IgG es fuerte en condiciones ácidas (pH 5,5 a pH 6,0) pero notoriamente débil en condiciones neutras (pH 7,4). La mayor parte de dichas interacciones entre proteínas que cambian de forma dependiente del pH se asocia a los residuos de histidina. Dado que la pKa del residuo de histidina se encuentra en el entorno de pH 6,0 a 6,5, el estado de disociación de protones de los residuos de histidina varía entre condiciones neutras (pH 7,4) y condiciones ácidas (pH 5,5 a 6,0). De manera específica, los residuos de histidina no presentan carga y funcionan como aceptores de átomos de hidrógeno en condiciones neutras (pH 7,4), mientras que adquieren carga positiva y funcionan como donantes de átomos de hidrógeno en condiciones ácidas (pH 5,5 a 6,0). Se ha registrado que la unión dependiente del pH de la interacción entre IgG y FcRn que se describió anteriormente también se asocia a los residuos de histidina presentes en IgG (Mol. Cell. Abril 2001; 7(4): 867-77).

Por lo tanto, se puede impartir dependencia del pH a las interacciones entre proteínas mediante la sustitución de un residuo de aminoácido implicado en las interacciones entre proteínas con un residuo de histidina o mediante la introducción de una histidina en un sitio de interacción. Dichos intentos también se han realizado en interacciones entre proteínas entre anticuerpos y antígenos, y se ha adquirido de manera satisfactoria un anticuerpo mutante con capacidad de unión al antígeno disminuida en condiciones ácidas mediante la introducción de histidina en la secuencia de CDR de un anticuerpo de lisozima anti-clara de huevo (FEBS Letter (tomo 309, No. 1, 85-88, 1992)). Además, se ha registrado un anticuerpo que se prepara mediante la introducción de histidina en su secuencia de CDR y se une específicamente a un antígeno a pH bajo de tejidos de cáncer pero se une de forma débil en condiciones neutras (WO 2003-105757).

Si bien se han registrado métodos para introducir la dependencia del pH en las reacciones entre antígeno y anticuerpo como se describió anteriormente, no se ha registrado una molécula de IgG que neutraliza varios antígenos mediante unión firme a los antígenos a pH de fluido corporal de 7,4 pero unión débil a los antígenos a pH intraendosómico de pH 5,5 a 6,0. Dicho de otro modo, no se han registrado modificaciones que reduzcan de manera significativa la unión en condiciones ácidas a la vez que se mantiene la unión en condiciones neutras de manera que, en comparación con un anticuerpo no modificado, un anticuerpo modificado se una a los antígenos varias veces *in vivo* y muestra así mejor farmacocinética, así como una mejor duración del efecto de neutralización a la misma dosis.

El receptor de IL-6 se encuentra presente en el cuerpo en forma de receptor de IL-6 soluble o receptor de IL-6 de membrana (Nat. Clin. Pract. Rheumatol. Noviembre 2006; 2(11): 619-26). Los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 se unen tanto al receptor de IL-6 soluble como al receptor de IL-6 de membrana y neutralizan su acción biológica. Se considera que, después de la unión al receptor de IL-6 de membrana, los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 se

absorben en endosomas intracelulares mediante internalización mientras se encuentran unidos al receptor de IL-6 de membrana, luego se mueven hacia lisosomas mientras que los anticuerpos se mantienen unidos al receptor de IL-6 de membrana, y experimentan degradación mediante lisosomas junto con el receptor de IL-6 de membrana. De hecho, se ha registrado que un anticuerpo del receptor de anti-IL-6 humanizado presenta depuración no lineal, y su eliminación dependiente del antígeno contribuye mucho a la eliminación del anticuerpo del receptor de anti-IL-6 humanizado (The Journal of Rheumatology, 2003, 30; 71426-1435). Por lo tanto, un anticuerpo del receptor de anti-IL-6 humanizado se une a uno o más receptores de IL-6 de membrana (de forma monovalente o divalente) y luego se internaliza y degrada en lisosomas. Por lo tanto, si fuera posible producir anticuerpos modificados que presentan capacidad de unión muy reducida en condiciones ácidas pero mantienen la misma capacidad de unión que el anticuerpo del receptor de anti-IL-6 humanizado de tipo silvestre en condiciones neutras (anticuerpo del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH), se pueden neutralizar varios receptores de IL-6 con un único anticuerpo del receptor de anti-IL-6 humanizado. Por lo tanto, en comparación con los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 humanizado de tipo silvestre, los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH pueden mejorar la duración del efecto de neutralización *in vivo* con la misma dosificación.

15 Producción de anticuerpo del receptor de anti-IL-6 humanizado de unión dependiente del pH H3pl/L73:

Se ha registrado la introducción de histidina en una CDR como un método para la introducción de unión dependiente del pH a reacción entre antígeno y anticuerpo (FEBS Letter (tomo 309, No. 1, 85-88, 1992)). A los efectos de encontrar residuos de aminoácidos expuestos en la superficie de la región variable del H53/PF1L producido en el Ejemplo 1 y los residuos posibles que interactúan con el antígeno, se creó un modelo de región Fv de H53/PFIL mediante modelado de homología usando el software MOE (Chemical Computing Group Inc.). Se usó un modelo tridimensional construido en base a la información de secuencia de H53/PF1L para seleccionar H27, H31, H35, L28, L32 y L53 (numeración de Kabat, Kabat, E.A. et al, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH) como sitios de mutación que pueden introducir la unión al antígeno dependiente del pH mediante la introducción de histidina. El producto en el que los residuos en H27, H31 y H35 en H53 producidos en el Ejemplo 1 se sustituyeron con histidinas se designó H3pl (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 3), y el producto en el que los residuos en L28, L32 y L53 en PF1L producidos en el Ejemplo 1 se sustituyeron con histidinas se designó L73 (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 6).

20 Producción, expresión y purificación de vector de expresión H3pl/L73

La modificación de aminoácidos se realizó para producir los anticuerpos modificados en los sitios seleccionados. Se introdujeron mutaciones en H53 (secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 13) y PF1L (secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO: 14) producidas en el Ejemplo 1 para producir H3pl (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 3) y L73 (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 6). Más específicamente, se utilizó el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene) de acuerdo con el método descrito en las instrucciones proporcionadas, y se insertaron los fragmentos de plásmido resultantes en un vector de expresión celular de mamífero para producir el vector de expresión de cadena H y el vector de expresión de cadena L deseados. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de los vectores de expresión resultantes usando un método conocido por las personas expertas en la técnica. Se expresó y purificó H3pl/L73 que usa H3pl para la cadena H y L73 para la cadena L mediante el método que se describió en el Ejemplo 1.

40 [Ejemplo 3] Otorgamiento de capacidad de unión al antígeno dependiente del pH mediante modificación His de CDR usando tecnología de expresión en fagos

Producción de molécula scFv de anticuerpo PM1 humanizado

Se convirtió el anticuerpo PM1 humanizado, que es un anticuerpo anti-IL-6R humanizado (Cancer Res. 15 feb 1993; 53(4): 851-6) en scFv. Se amplificaron las regiones VH y VL mediante PCR, y se produjo scFv HL PM1 humanizado con la secuencia enlazadora GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 15) entre VH y VL.

45 Selección de posiciones en las que se puede introducir histidina mediante barrido de histidina

Se realizó PCR usando el ADN scFv HL PM1 humanizado producido como plantilla para producir una genoteca de histidina en la cual cualquiera de los aminoácidos de CDR se reemplaza con histidina. Las partes de genoteca se construyeron mediante PCR usando cebadores en los cuales el codón de un aminoácido que se desea mutar para la genoteca se reemplazó con CAT, un codón que corresponde a histidina, y otras partes se construyeron mediante PCR normal. Luego estas partes se unen mediante PCR de complejo. La genoteca construida se digirió con SfiI, se insertó en un vector de fagémido pELBG lacl que también se digirió con SfiI y luego se usó para transformar XL 1-Blue (Stratagene). Se usaron las colonias resultantes para evaluar la unión al antígeno mediante ELISA en fagos y analizar la secuencia de scFv HL. Se realizó ELISA en fagos usando una placa recubierta con SR344 a 1 µg/mL de acuerdo con J. Mol. Biol. 1992; 227: 381-388. Los clones que se descubrió que se unieron a SR344 se sometieron a análisis de secuencias usando cebadores específicos.

Se determinó la titulación en fagos mediante ELISA con un anticuerpo anti-Etag (GE Healthcare) y anticuerpo anti-MI3 (GE Healthcare). Este valor luego se usó para seleccionar posiciones en las que la sustitución del residuo de CDR con histidina no modificó de manera significativa la capacidad de unión en comparación con scFv HL PM1 en

función de los resultados de ELISA en fagos para SR344. Las posiciones seleccionadas se muestran en la Tabla 2. La numeración de cada residuo coincide con la numeración de Kabat (Kabat, et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH).

[Tabla 2] Posiciones de la sustitución de histidina que no afectan de forma significativa la capacidad de unión

5 H31, H50, H54, H56, H57, H58, H59, H60, H61, H62, H63, H64, H65, H100a, H100b, H102 L24, L26, L27, L28, L30, L31, L32, L52, L53, L54, L56, L90, L92, L93, L94

Construcción de genoteca de CDR modificada con histidina

10 Se diseñó una genoteca en la que los aminoácidos de los residuos de CDR que no modificaron de manera significativa la capacidad de unión cuando se sustituyeron con histidina como se muestra en la Tabla 2 (posiciones en las que se puede introducir histidina) son su secuencia original (secuencia de tipo silvestre) o histidina. Se construyó la genoteca en función de las secuencias de PF1H de cadena H y PF1L de cadena L producidas en el Ejemplo 1 de manera que las posiciones mutadas para la genoteca tengan las secuencias originales o histidinas (ya sea la secuencia original o histidina).

15 Las partes de genoteca se construyeron mediante PCR usando cebadores que se diseñaron de manera que una posición que se desea mutar para la genoteca tenga el codón de aminoácido original o codón de histidina, y se produjeron otras partes mediante PCR normal o mediante PCR usando cebadores sintéticos como en las partes de genoteca. Luego estas partes se unieron mediante PCR de complejo (J. Mol. Biol. 1996; 256: 77-88).

20 Esta genoteca se utilizó para construir una genoteca de expresión de ribosomas de acuerdo con J. Immunological Methods 1999; 231: 119-135. A los efectos de realizar traducción *in vitro* sin células de *Escherichia coli*, se agregaron una secuencia de SDA (sitio de unión al ribosoma) y promotor T7 al lado 5', y se ligó una secuencia parcial gen3 que sirve como enlazador para la expresión de ribosoma la lado 3' usando Sfil.

Adquisición de scFv de unión dependiente de pH de genoteca mediante cribado de perlas

25 A los efectos de concentrar solamente scFv con la capacidad de unirse a SR344, el cribado se realizó dos veces mediante el método de expresión de ribosomas de acuerdo con Nature Biotechnology diciembre 2000; 18: 1287-1292. El SR344 preparado se biotiniló usando NHS-PE04-Biotin (Pierce) para obtener un antígeno. El cribado se realizó usando 40 nM del antígeno biotinilado

Usando el conjunto de ADN resultante como plantilla, se restituyó scFv HL mediante PCR usando cebadores específicos. Después de digerir con Sfil, el scFv HL digerido se insertó en un vector de fagémido pELBG lacl que también se digirió con Sfil y luego se usó para transformar XL 1-Blue (Stratagene).

30 Se cultivaron células de *Escherichia coli* que contienen el plásmido deseado hasta 0,4 a 0,6 O.D./mL en medio 2YT que contenía 100 µg/mL de ampicilina y glucosa al 2 %. Se agregó un fago de ayuda (M13K07, $4,5 \times 10^{11}$ pfu) a esto, se cultivó de forma estática durante 30 minutos a 37 °C y luego se cultivó con agitación durante 30 minutos a 37 °C. El cultivo se transfirió a un tubo Falcon de 50 mL, se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm, se volvió a suspender en medio 2YT que contenía 100 µg/mL de ampicilina, 25 µg/mL de kanamicina y 0,5 mM de IPTG, y
35 luego se incubó durante la noche a 30 °C.

40 El cultivo incubado durante la noche se precipitó con NaCl 2,5 M y PEG al 10 %, y luego se diluyó con PBS para obtener una solución de genoteca de fagos. Se agregaron M-PBS al 10 % (PBS con leche desnatada al 10 %) y Tris-HCl 1 M a la solución de genoteca de fagos hasta la concentración final de M-PBS al 2,5 % y pH 7,4. Se realizó el cribado mediante un método de cribado típico usando un antígeno inmovilizado en perlas magnéticas (J. Immunol. Methods 20 marzo 2008; 332(1-2): 2-9; J. Immunol. Methods 1 enero 2001; 247(1-2): 191-203; Biotechnol. Prog. marzo-abril 2002; 18(2): 212-20). Más específicamente, se agregaron 40 pmol de SR344 etiquetado con biotina a la genoteca de fagos preparada y la genoteca se puso en contacto con el antígeno durante 60 minutos a 37 °C.

45 Se agregaron perlas recubiertas con estreptavidina (Dynal M-280) lavadas con M-PBS al 5 % (PBS con leche desnatada al 5 %) y se dejó que se unieran durante 15 minutos a 37 °C. Las perlas se lavaron cinco veces con 0,5 ml de PBST (PBS con Tween-20 al 0,1 %, pH 7,4) y PBS (pH 7,4).

50 Las perlas luego se suspendieron en 1 mL de PBS (pH 5,5) a 37 °C, y el fago se recuperó de inmediato. La solución de fagos recuperada se agregó a 10 mL de XLI-Blue de fase de crecimiento logarítmico (OD600 de 0,4 a 0,5) y se dejó en reposo durante 30 minutos a 37 °C para la infección. Las *E. coli* infectadas se colocaron en placas en una placa de 225 mm x 225 mm con 2 YT, 100 µg/mL de ampicilina y glucosa al 2 %. Estas *E. coli* se utilizaron para comenzar el cultivo en fagos adicional de la misma manera que se describió anteriormente y repetir el cribado 8 veces.

Evaluación mediante ELISA en fagos

Se inocularon las colonias únicas anteriores en 100 µL de 2YT, 100 µg/mL de ampicilina, glucosa al 2 % y 12,5 µg/mL de tetraciclina y se cultivaron durante la noche a 30 °C. 2 µL de este cultivo se inoculó en 300 µL de 2YT, 100

µg/mL de ampicilina y glucosa al 2 % y luego se cultivó durante 4 horas a 37 °C. Se agregó un fago de ayuda (M13K07) al cultivo a 9×10^8 pfu, se dejó reposar durante 30 minutos a 37 °C y luego se agitó durante 30 minutos a 37 °C para la infección.

5 Posteriormente, el medio se reemplazó con 300 µL de 2 YT, 100 µg/mL de ampicilina, 25 µg/mL de kanamicina y 0,5 mM de IPTG. Después del cultivo durante la noche a 30 °C, se recuperó el sobrenadante centrifugado. Se agregaron 360 µL de 50 mM PBS (pH 7,4) a 40 µL del sobrenadante centrifugado y se sometió a ELISA. Se recubrió una placa de microtitulación de 96 pocillos StreptaWell (Roche) durante la noche con 100 µL de PBS con 62,5 ng/mL de SR344 etiquetado con biotina. Después de retirar el antígeno mediante lavado con PBST, se realizó el bloqueo con 250 µL de BSA-PBS al 2 % durante 1 hora o más. Después de retirar el BSA-PBS al 2 %, se agregó el sobrenadante de cultivo preparado y se dejó reposar durante 1 hora a 37 °C para la unión al anticuerpo. Después del lavado, se agregaron 50 mM de PBS (pH 7,4) o 50 mM de PBS (pH 5,5) y se incubaron mediante reposo durante 30 minutos a 37 °C. Después del lavado, se realizó la detección con un anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP (Amersham Pharmacia Biotech) diluido con BSA-PBS al 2 % y solución simple de TMB (Zymed), seguido de adición de ácido sulfúrico para detener la reacción y la medición de la absorbancia a 450 nm.

15 Sin embargo, no se obtuvieron clones que presentaran capacidad de unión dependiente del pH fuerte mediante este cribado usando el antígeno inmovilizado en las perlas magnéticas. Los clones que se descubrió que demostraron capacidad de unión dependiente del pH débil se sometieron a análisis de secuencias usando cebadores específicos. Las posiciones en estos clones en los que había histidina en un índice alto se muestran en la Tabla 3.

20 [Tabla 3] Posiciones de sustitución de histidina detectada usando genoteca de fagos (cribado con perlas magnéticas)

H50, H58, H61, H62, H63, H64, H65, H102

L24, L27, L28, L32, L53, L56, L90, L92, L94

Adquisición de scFv de unión dependiente de pH de genoteca mediante cribado en columna

25 No se obtuvieron clones con capacidad de unión dependiente del pH fuerte mediante el cribado típico usando el antígeno inmovilizado con perlas magnéticas. Esto puede deberse a las siguientes razones. En el cribado utilizando un antígeno inmovilizado en perlas magnéticas o una placa, se recogen todos los fagos disociados de las perlas magnéticas o placa en condiciones ácidas. Por lo tanto, los clones de fagos con dependencia de pH débil recuperados juntos reducen la probabilidad de que los clones con dependencia de pH fuerte se incluyan en los clones finalmente concentrados.

30 Por lo tanto, se examinó el cribado usando una columna inmovilizada con un antígeno como método de cribado más riguroso (Fig. 5). No ha habido informes previos sobre la adquisición de clones con capacidad de unión dependiente de pH mediante el uso de cribado con una columna inmovilizada con antígeno. En el cribado usando una columna inmovilizada con antígeno, cuando los fagos que se han unido en condiciones neutras se eluyen en condiciones ácidas, los clones con dependencia de pH débil se vuelven a unir al antígeno dentro de la columna y, por lo tanto, se eluyen menos, lo que permite que los clones más dependientes del pH que menos se vuelven a unir dentro de la columna se eluyan de la columna de manera selectiva. Además, si bien "todos" los fagos que se han disociado en condiciones ácidas se recuperan en el cribado usando el antígeno inmovilizado en las perlas magnéticas o una placa, el cribado que usa una columna inmovilizada con el antígeno permite la recuperación selectiva de fagos con capacidad de unión dependiente del pH fuerte permitiendo que un amortiguador ácido fluya a través de la columna para comenzar la elución y recuperando solamente las "fracciones apropiadas".

40 En primer lugar, se preparó una columna en la cual se inmovilizó el antígeno SR344. Se lavaron 200 µL de estreptavidina Sepharose (GE Healthcare) con 1 ml de PBS, se suspendieron en 500 µL de PBS, y se pusieron en contacto con 400 pmol de SR344 etiquetado con biotina durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se llenó una columna vacía (Amersham Pharmacia Biotech) con sepharose anterior y se lavó con aproximadamente 3 mL de PBS. Los fagos de genoteca precipitados con PEG mencionados anteriormente se diluyeron hasta 1/25 con BSA-PBS al 0,5 % (pH 7,4), se pasaron a través de un filtro de 0,45 µm y luego se agregaron a la columna. Después del lavado con aproximadamente 6 mL de PBS (pH 7,4), 50 mM de MES-NaCl (pH 5,5) se dejó fluir a través de la columna para eluir los anticuerpos que se disocian a pH bajo. Las fracciones eluidas apropiadas se recogieron y la solución de fagos recuperada se agregó a 10 mL de XLI-Blue de fase de crecimiento logarítmico (OD600 de 0,4 a 0,5) y se dejó en reposo durante 30 minutos a 37 °C.

45 Las *E. coli* infectadas se colocaron en una placa de 225 mm x 225 mm con 2 YT, 100 µg/mL de ampicilina y glucosa al 2 %. Estas *E. coli* se utilizaron para comenzar el cultivo en fagos adicional de la misma manera que se describió anteriormente y repetir el cribado 6 veces.

Evaluación mediante ELISA en fagos

55 Los fagos resultantes se evaluaron mediante ELISA en fagos. Los clones que se descubrió que eran muy dependientes del pH se sometieron a análisis de secuencias usando cebadores específicos. Como resultado, se

obtuvieron varios clones que presentaron unión dependiente del pH fuerte en comparación con WT. Como se muestra en la Fig. 6, se descubrió que el clon CL5 (cadena H: CLH5, cadena L: CLL5) (CLH5: secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, CLL5: secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8) presentaba capacidad de unión dependiente del pH particularmente fuerte en comparación con WT. Por lo tanto, se confirmó que los anticuerpos que presentaban unión dependiente del pH fuerte, si bien no se pudieron obtener mediante el cribado típico usando el antígeno inmovilizado en perlas magnéticas, se pueden obtener mediante cribado usando una columna inmovilizada con el antígeno. Por lo tanto, se descubrió que el cribado usando una columna inmovilizada con antígeno era un método muy eficaz para obtener los anticuerpos de unión dependiente del pH de una genoteca. Se analizaron las secuencias de aminoácidos de los clones que muestran unión dependiente del pH, y las posiciones en las que histidina se encontraba presente con alta probabilidad en los clones concentrados se muestran en la Tabla 4.

[Tabla 4] Posiciones de sustitución de histidina descubiertas mediante genoteca de fagos (cribado en columnas)

H31, H50, H58, H62, H63, H65, H100b, H102

L24, L27, L28, L32, L53, L56, L90, L92, L94

[Ejemplo 4] Expresión y purificación de anticuerpo del receptor de IL-6 humanizado modificado con histidina

Producción, expresión y purificación del vector de expresión del anticuerpo del receptor de IL-6 humanizado modificado con histidina

A los efectos de convertir los clones que muestran fuerte dependencia del pH en ELISA en fagos a IgG, se amplificaron VH y VL, respectivamente, mediante PCR, se digirieron con XhoI/NheI y EcoRI, y se insertaron en un vector de expresión celular de mamífero. Se determinó la secuencia de nucleótidos de cada fragmento de ADN mediante un método conocido por las personas expertas en la técnica. Se utilizó CLH5/L73, en donde se utilizó CLH5 para la cadena H y se utilizó L73 obtenido en el Ejemplo 2 para la cadena L, se expresó y purificó como IgG. La expresión y purificación se realizó mediante el método que se describe en el Ejemplo 1.

El anticuerpo con dependencia del pH incluso más alta se produjo combinando los sitios de mutación. En función de la ubicación en la que His se concentró en la genoteca de fagos, así como la información estructural y similares, H32, H58, H62 y H102 en H3pl que se obtuvieron como cadena H en el Ejemplo 2 se sustituyeron con histidina, y H95 y H99 se sustituyeron adicionalmente con valina e isoleucina, respectivamente, para producir H170 (SEQ ID NO: 4). La producción variante se realizó mediante el método que se describe en el Ejemplo 1. Además, se produjo L82 (SEQ ID NO: 7) mediante la sustitución de la histidina 28 de L73, que se produjo como cadena L en el Ejemplo 2, con ácido aspártico. La producción variante se realizó mediante el método que se describe en el Ejemplo 1. H170/L82, en donde se utilizó H170 para la cadena H y se utilizó L82 para la cadena L, se expresó y purificó como IgG usando el método que se describe en el Ejemplo 1.

[Ejemplo 5] Evaluación de la actividad de neutralización de IL-6R del anticuerpo de unión dependiente del pH

Evaluación de la actividad de neutralización del receptor de IL-6 humano de clones convertidos a IgG

Se evaluó la actividad de neutralización del receptor de IL-6 para cuatro anticuerpos: anticuerpo PM1 humanizado (WT) y H3pl/L73, CLH5/L73 y H170/L82 producidos en los Ejemplos 2 y 4.

Más específicamente, se evaluó la actividad de neutralización del receptor de IL-6 usando BaF3/gp130 que presenta crecimiento dependiente del receptor de IL-6/IL-6. Se lavó BaF3/gp130 tres veces con medio RPMI1640 con FBS al 10 %, luego se suspendió a 5×10^4 células/mL en medio RPMI1640 con 60 ng/mL de interleucina humana-6 (Toray), 60 ng/mL del receptor de IL-6 humano soluble recombinante (SR344) y FBS al 10 %. Se colocaron 50 μ L de la suspensión en cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos (Coming). A continuación, el anticuerpo purificado se diluyó con RPMI1640 que contenía FBS al 10 %, y se mezclaron 50 μ L del anticuerpo en cada pocillo. Después del cultivo durante 3 días a 37 °C y CO₂ al 5 %, se agregó reactivo WST-8 (Cell Counting Kit-8, Dojindo Laboratories) diluido dos veces con PBS a 20 μ L/pocillo, y luego se midió inmediatamente para determinar la absorbancia a 450 nm (longitud de onda de referencia: 620 nm) con Sunrise Classic (Tecan). Después del cultivo durante 2 horas, se midió la absorbancia a 450 nm nuevamente (longitud de onda de referencia: 620 nm). Se evaluó la actividad de neutralización del receptor de IL-6 en función del cambio en la absorbancia después de 2 horas. Como resultado, como se muestra en la Fig. 7, se muestra que H3pl/L73, CLH5/L73 y H170/L82 tienen actividad de neutralización biológica equivalente en comparación con el anticuerpo PM1 humanizado (WT).

[Ejemplo 6] Análisis Biacore de anticuerpo de unión dependiente del pH Análisis de unión de clones de unión dependiente de pH al receptor de IL-6 soluble

Los análisis cinéticos de las reacciones entre antígeno y anticuerpo a pH 5,8 y pH 7,4 se realizaron usando Biacore T100 (GE Healthcare) en los cuatro anticuerpos: anticuerpo PM1 humanizado (WT) y H3pl/L73, CLH5/L73 y H170/L82 producidos en los Ejemplos 2 y 4 (amortiguador: 10 mM de MES (pH 7,4 o pH 5,8), 150 mM de NaCl, y Tween 20 al 0,05 %). Se unieron varios anticuerpos a un chip sensor inmovilizado con proteína recombinante A/G

(Pierce) mediante acoplamiento con amina. Se inyectó SR344 ajustado a las concentraciones de 9,8 a 400 nM al chip como un analito. Se observó la asociación y disociación de los clones de unión dependiente del pH a SR344 en tiempo real (Figs. 8 y 9). Todas las mediciones se realizaron a 37 °C. Se calcularon las constantes de velocidad de asociación k_a (1/Ms) y las constantes de velocidad de disociación k_d (1/s) usando Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare), y se calcularon las constantes de disociación KD (M) en función de estos valores (Tabla 5). Además, la relación de las afinidades a pH 5,8 y pH 7,4 se calcularon para cada clon para evaluar la unión dependiente del pH. Todas las mediciones se realizaron a 37 °C.

Como resultado de calcular la relación de afinidad entre pH 5,8 y pH 7,4 para cada clon, la unión dependiente del pH (afinidad) de H3p/L73, H170/L82 y CLH5/L73 a SR344 fue de 41 veces, 394 veces y 66 veces, respectivamente, cada uno de los cuales muestra la unión dependiente del pH más de 15 veces más que WT.

Aún no se han registrado anticuerpos del receptor de anti-IL-6 que se unen fuertemente al antígeno a pH de plasma de 7,4 pero se unen débilmente al antígeno a pH intraendosómico de 5,5 a 6,0. En este estudio, se obtuvieron anticuerpos que conservan la actividad de neutralización biológica equivalente al anticuerpo del receptor de IL-6 humanizado WT y la afinidad a pH 7,4, pero presentan afinidad a pH 5,8 que se ha disminuido específicamente más de 10 veces.

[Tabla 5] Comparación de la unión de los clones de unión dependientes del pH dirigidos contra SR344 al receptor de IL-6 soluble

	pH7,4			pH5,8			KD(pH5,8)/KD(pH7,4)
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD(M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD(M)	
WT	5,1E+05	1,0E-03	2,1E-09	7,6E+05	3,8E-03	5,0E-09	2,4
H3p/L73	5,4E+05	7,4E-04	1,4E-09	1,7E+05	9,7E-03	5,7E-08	41,3
H170/L82	6,8E+05	1,1E-03	1,6E-09	2,6E+04	1,7E-02	6,4E-07	393,5
CLH5/L73	7,1E+05	7,9E-04	1,1E-09	3,8E+05	2,8E-02	7,4E-08	66,1

Análisis de la unión de los clones de unión dependiente del pH al receptor de IL-6 de membrana

Se observaron reacciones de antígeno-anticuerpo al receptor de IL-6 de membrana a pH 5,8 y pH 7,4 para los clones de unión dependiente del pH producidos anteriormente, usando Biacore T100 (GE Healthcare). Se evaluó el receptor de IL-6 de membrana evaluando la unión al receptor de IL-6 inmovilizado en un chip sensor. Se biotiniló SR344 de acuerdo con un método conocido por las personas expertas en la técnica y el SR344 biotinilado se inmovilizó en el chip sensor mediante estreptavidina mediante el uso de la afinidad entre estreptavidina y biotina. Todas las mediciones se realizaron a 37 °C, y el amortiguador de fase móvil contenía 10 mM de MES (pH 5,8), 150 mM de NaCl y Tween 20 al 0,05 %. Se inyectaron los clones de unión dependiente del pH allí en condiciones de pH 7,4 y se permitió que se unieran a SR344 (amortiguador de muestra de inyección: 10 mM de MES (pH 7,4), 150 mM de NaCl, Tween 20 al 0,05 %), y se observó la disociación dependiente del pH de cada clon a pH de fase móvil de 5,8 (Fig. 10).

Se calculó la velocidad de disociación (k_d (1/s)) a pH 5,8 usando Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare) ajustando solamente la fase de disociación a pH 5,8, en donde 0,5 µg/mL de la muestra se unió en 10 mM de MES (pH 7,4), 150 mM de NaCl y Tween 20 al 0,05 %, y se disoció en 10 mM de MES (pH 5,8), 150 mM de NaCl y Tween 20 al 0,05 %. De manera similar, se calculó la velocidad de disociación (k_d (1/s)) a pH 7,4 usando Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare) ajustando solamente la fase de disociación a pH 7,4, en donde 0,5 µg/mL de la muestra se unió en 10 mM de MES (pH 7,4), 150 mM de NaCl y Tween 20 al 0,05 %, y se disoció en 10 mM de MES (pH 7,4), 150 mM de NaCl y Tween 20 al 0,05 %. La constante de velocidad de disociación dependiente del pH de cada clon se muestra en la Tabla 6.

[Tabla 6] Comparación de la constante de velocidad de disociación de clones de unión dependiente del pH dirigidos contra SR344 del receptor de IL-6 de membrana

	kd(1/s)		relación de kd
	pH7,4	pH5,8	pH5,8/pH7,4
WT	4,84E-04	7,15E-04	1,5
H3p/L73	3,44E-04	3,78E-03	11,0
H170/L82	7,70E-04	1,44E-03	1,9
CLH5/L73	1,04E-03	5,67E-03	5,5

Se observó la dependencia del pH más alta de la relación de disociación en H3pl/L73 seguido por CLH5/L73 y H170/L82 en orden descendente y cada clon demostró una disociación del receptor de IL-6 de membrana dependiente del pH más alta que WT. Sin embargo, la clasificación de la asociación/disociación dependiente del pH fue distinta entre el receptor de IL-6 soluble y el receptor de IL-6 de membrana. Se reveló que H170/L82, que presentó la unión dependiente del pH más alta en el análisis de unión al receptor de IL-6 soluble, mostró la unión dependiente del pH más baja en el análisis de la unión al receptor de IL-6 de membrana. En general, se sabe que si bien las moléculas de IgG se unen de forma monovalente a un antígeno soluble (afinidad), se unen de forma divalente a los antígenos de membrana (avidéz). Se sugiere que esta diferencia en el modo de unión entre antígenos solubles y antígenos de membrana influyó la unión dependiente del pH de H170/L82.

10 [Ejemplo 7] Confirmación de unión múltiple al antígeno mediante el anticuerpo de unión dependiente del pH

Como se describe en el Ejemplo 2, los anticuerpos de unión dependientes del pH pueden unirse a los antígenos varias veces. De manera específica, un anticuerpo de unión dependiente del pH que se ha unido a un antígeno no se absorbe específicamente en endosomas, pero se disoció del antígeno soluble en condiciones ácidas intraendosómicas. El anticuerpo se une a FcRn y, por lo tanto, regresa al plasma. Dado que el anticuerpo que ha regresado al plasma no se une al antígeno, puede unirse a un nuevo antígeno otra vez. La repetición de este proceso permite que los anticuerpos de unión dependientes del pH se unan a los antígenos varias veces. Sin embargo, para los anticuerpos de IgG que no presentan capacidad de unión dependiente del pH, no todos los antígenos se disocian de los anticuerpos en condiciones ácidas intraendosómicas. Por lo tanto, dichos anticuerpos que han regresado al plasma mediante FcRn permanecen unidos al antígeno y, por lo tanto, no pueden unirse a nuevos antígenos. Por consiguiente, en casi todos los casos, cada molécula simple de anticuerpo de IgG puede neutralizar solamente dos antígenos (en caso de unión divalente).

Por lo tanto, se evaluó si los tres anticuerpos de unión dependiente del pH (H3pl/L73, CLH5/L73 y H170/L82) contruidos en los Ejemplos 2 y 4 podían unirse al antígeno SR344 varias veces en comparación con el anticuerpo PM1 humanizado (tipo silvestre, WT).

25 Se usó Biacore (GE Healthcare) para evaluar que los anticuerpos que se unen a pH 7,4 y se disocian a pH 5,8 pudieron unirse al antígeno varias veces. El anticuerpo que se debía evaluar se unió a un chip sensor inmovilizado con proteína recombinante A/G (Pierce) mediante el método de acoplamiento de amina y se permitió el flujo de una fase móvil de pH 7,4 (etapa 1). Luego se dejó que la solución de SR344 ajustada a pH 7,4 fluyera como un analito para unir SR344 al anticuerpo a pH 7,4 (etapa 2). Esta unión a pH 7,4 imita la unión al antígeno en plasma. Posteriormente, se agregó el amortiguador ajustado a pH 5,8 solo (que no contenía SR344) como un analito para exponer el antígeno unido al anticuerpo a condiciones ácidas (etapa 3). Esta disociación a pH 5,8 imita el estado de unión de los complejos antígeno-anticuerpo en endosomas. Posteriormente, se repitió la etapa 2. Esto imita la re-unión del anticuerpo que ha regresado al plasma mediante FcRn a un nuevo antígeno. Posteriormente, se repitió la etapa 2 para exponer el complejo anticuerpo-antígeno a condiciones ácidas. La repetición de la "etapa 2 a la etapa 3" varias veces a 37 °C como se describió anteriormente puede imitar el estado *in vivo* en el que los anticuerpos se absorben de forma reiterada del plasma en endosomas mediante pinocitosis y regresan al plasma mediante FcRn (Nat. Rev. Immunol. septiembre 2007; 7(9): 715-25).

40 Los clones de unión dependiente del pH producidos descritos anteriormente se analizaron usando Biacore T100 (GE Healthcare) para determinar su capacidad de unirse al antígeno SR344 varias veces a pH 5,8 y pH 7,4. Más específicamente, el análisis se llevó a cabo de la siguiente manera. Todas las mediciones se realizaron a 37 °C. En primer lugar, los anticuerpos de muestra que se describieron anteriormente se unieron en un chip sensor inmovilizado con una proteína recombinante A/G (Pierce), en donde el amortiguador de fase móvil fue 10 mM de MES (pH 5,8), 150 mM de NaCl y Tween 20 al 0,05 % (etapa 1).

45 Se inyectó SR344 ajustado a una concentración de aproximadamente 40 nM como un analito durante 3 minutos a pH 7,4 y se dejó que se uniera (el amortiguador para SR344 inyectado fue 10 mM de MES (pH 7,4), 150 mM de NaCl y Tween 20 al 0,05 %) (etapa 2). Posteriormente, se interrumpió la inyección de SR344 y se dejó que una fase móvil de pH 5,8 fluyera durante aproximadamente 70 segundos para exponer el complejo anticuerpo/SR344 en condiciones ácidas (etapa 3). Se repitieron de forma continua diez conjuntos de este proceso de unión (etapa 2)/exposición a acidez (etapa 3) para observar el sensograma en tiempo real, lo que se muestra en la Fig. 11. WT mostró menos disociación de SR344 durante la exposición ácida en la etapa 3 y, posteriormente, la proporción de anticuerpo que puede unirse a nuevos antígenos en la etapa 2 posterior fue extremadamente baja. Por el contrario, se descubrió que los clones de unión dependiente del pH, particularmente H170/L82 y CLH5/L73, demostraron una disociación tan fuerte durante la exposición ácida en la etapa 3 que la mayoría del SR344 unido se disoció y, por lo tanto, casi todos los anticuerpos pudieron unirse a nuevos antígenos en la etapa 2 posterior. En la repetición de 10 conjuntos de la unión (etapa 2) y exposición ácida (etapa 3), casi todos los anticuerpos H170/L82 y CLH5/L73 pudieron unirse a nuevos antígenos en cada conjunto.

60 Los sensogramas obtenidos se utilizaron para calcular la cantidad de unión de SR344 en cada conjunto para cada muestra usando Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare). Los valores integrados en el periodo de tiempo de los 10 conjuntos se muestran en la Fig. 12. Los valores de RU integrados obtenidos en el conjunto número 10 son equivalentes a la cantidad total de antígenos unidos durante los diez ciclos. Los clones de unión dependientes

del pH, particularmente H170/L82 y CLH5/L73, demostraron las mayores cantidades totales de antígenos unidos en comparación con WT y demostraron poder unirse de forma reiterada a casi cuatro veces la cantidad de antígenos unidos con WT. Por consiguiente, se reveló que al otorgar capacidad de unión dependiente del pH a WT, dichos anticuerpos pueden unirse de forma reiterada a los antígenos y neutralizar así varios antígenos.

5 [Ejemplo 8] Prueba de PK/PD de anticuerpo de unión dependiente del pH usando ratones transgénicos del receptor de IL-6 humano

Los receptores de IL-6 se encuentran presentes en el cuerpo en forma de receptor de IL-6 soluble y en forma de receptor de IL-6 tipo membrana (Nat. Clin. Pract. Rheumatol. Noviembre 2006; 2(11): 619-26). Los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 se unen a los receptores de IL-6 solubles y receptores de IL-6 tipo membrana y neutralizan su acción biológica. Se cree que un anticuerpo del receptor de anti-IL-6 se une a un receptor de IL-6 tipo membrana, se absorbe posteriormente en un endosoma dentro de una célula mediante internalización mientras que el anticuerpo se mantiene unido al receptor de IL-6 tipo membrana, y luego se mueve a un lisosoma mientras se mantiene unido al receptor de IL-6 tipo membrana en donde se degrada mediante lisosoma junto con el receptor de IL-6 tipo membrana. Si H3pl/L73, CLH5/L73 y H170/L82, que son los anticuerpos del receptor de IL-6 de unión dependiente del pH evaluados en el Ejemplo 6, pueden regresar al plasma mediante FcRn como resultado de la disociación en condiciones ácidas dentro de los endosomas, los anticuerpos que han regresado al plasma pueden unirse a los antígenos nuevamente. Esto permite la neutralización de varios receptores de IL-6 tipo membrana con una única molécula de anticuerpo. Ya sea que se logre el regreso al plasma mediante FcRn como resultado de la disociación en condiciones ácidas dentro de los endosomas con los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH construidos o no se puede determinar mediante la evaluación de si mejora la farmacocinética de estos anticuerpos en comparación con la farmacocinética de WT.

Por lo tanto, se evaluó la farmacocinética en ratones transgénicos del receptor de IL-6 humano (ratones transgénicos de hIL-6R, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 23 mayo 1995; 92(11): 4862-6) para los cuatro tipos de anticuerpos, es decir, anticuerpo PM 1 humanizado (tipo silvestre: WT) y H3pl/L73, CLH5/L73 y H170/L82 construidos en los Ejemplos 2 y 4. WT, H3pl/L73, CLH5/L73 o H170/L82 se administró mediante administración intravenosa de única dosis a ratones transgénicos de hIL-6R a 25 mg/kg, y se recogieron muestras de sangre, antes de la administración y con el transcurso del tiempo. La sangre recogida se centrifugó de inmediato durante 15 minutos a 15.000 rpm y 4 °C para obtener plasma. El plasma separado se almacenó en un congelador configurado a -20 °C o menos hasta que se realizaron las mediciones.

La medición de la concentración en plasma de ratón se realizó mediante ELISA. Se prepararon muestras para la curva de calibración a concentraciones de plasma de 6,4, 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2 y 0,1 µg/mL. Las muestras de la curva de calibración y las muestras de medición de plasma de ratón se suministraron a una inmunoplateca (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp (Nalge Nunc International)) inmovilizada con IgG anti-humana (específica de cadena γ) F(ab')₂ (Sigma), y se dejaron reposar sin alteraciones durante una hora a temperatura ambiente. Se dejaron reaccionar de forma secuencial IgG-BIOT anti-humano de cabra (Southern Biotechnology Associates) y conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics) y se realizó una reacción cromogénica usando BluePhos Microwell Phosphatase Substrates System (Kirkegaard & Perry Laboratories) como sustrato. Se midió la absorbancia a 650 nm con un lector de microplacas. Se calcularon las concentraciones en plasma de ratón de la absorbancia de la curva de calibración usando el software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). Los periodos de tiempo de las concentraciones en plasma de WT, así como H3pl/L73, CLH5/L73 y H170/L82 se muestran en la Fig. 13.

Se mejoró la farmacocinética para todos los siguientes H3pl/L73, CLH5/L73 y H170/L82 en comparación con WT. En particular, se mejoró la farmacocinética de H3pl/L73 y CLH5/L73 de manera considerable. Se absorbe un anticuerpo del receptor de anti-IL-6 de tipo silvestre (WT) unido al receptor de IL-6 tipo membrana en un endosoma dentro de una célula mediante internalización, se mueve a un lisosoma mientras que el anticuerpo se mantiene unido al antígeno y luego se degrada; por lo tanto, tiene un periodo de permanencia breve en el plasma. Por el contrario, dado que se mejoró la farmacocinética de los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH considerablemente, se considera que los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH regresan al plasma nuevamente mediante FcRn como resultado de la disociación del antígeno, el receptor de IL-6 tipo membrana, en condiciones ácidas dentro de los endosomas.

Si bien se mejoró la farmacocinética para todos los H3pl/L73, CLH5/L73 y H170/L82 en comparación con WT, el efecto de prolongación de la persistencia en plasma de H170/L82 fue más débil que el efecto de H3pl/L73 y CLH5/L73. Dado que se cree que las moléculas de IgG se unen normalmente de forma divalente al antígeno unido a la membrana, se cree que los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 también se unen de forma divalente (avidez) a los receptores de IL-6 tipo membrana y luego se internalizan. Como se indica en el Ejemplo 6, el análisis usando Biacore reveló que H170/L82 se disoció rápidamente del receptor de IL-6 a pH 5,8 cuando se unió al receptor de IL-6 soluble (FIG. 9), pero la velocidad de disociación de este del receptor de IL-6 a pH 5,8 cuando se unió al receptor de IL-6 tipo membrana fue extremadamente lenta (FIG. 10). A partir de este resultado, se cree que el motivo del efecto débil de prolongar el periodo de permanencia en plasma de H170/L82 es que el anticuerpo no pudo disociarse de forma adecuada dentro de los endosomas después de haberse internalizado debido a su disociación lenta a pH 5,8 cuando se une al receptor de IL-6 tipo membrana. A saber, como en el caso relacionado con los antígenos de membrana, se determinó que a los efectos de que una única molécula de IgG neutralice varios

antígenos de membrana, la dependencia del pH de la disociación de unión divalente (avidez) es más importante que la dependencia del pH de la unión monovalente (afinidad).

[Ejemplo 9] Prueba de PK/PD de anticuerpo de unión dependiente del pH usando monos cynomolgus

5 Dado que la farmacocinética de los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH mejoró considerablemente en el Ejemplo 8, se cree que los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH regresan al plasma mediante FcRn como resultado de la disociación del antígeno, el receptor de IL-6 tipo membrana, en condiciones ácidas dentro de los endosomas. Si los anticuerpos que han vuelto al plasma pueden unirse a los receptores de IL-6 tipo membrana nuevamente, se cree que la neutralización de un antígeno, el receptor de IL-6 tipo membrana, mediante los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH persiste por más tiempo que la neutralización mediante el anticuerpo del receptor de anti-IL-6 de tipo silvestre con la misma dosificación. Además, dado que el receptor de IL-6 soluble también está presente entre los receptores de IL-6, se cree que la duración de la neutralización es más prolongada para la misma dosificación con respecto al receptor de IL-6 soluble también.

15 Se evaluó la farmacocinética en monos cynomolgus para WT y H3pl/L73. Se administró WT o H3pl/L73 a monos cynomolgus mediante administración intravenosa en una única dosis a 1 mg/kg, y se recogieron muestras de sangre, antes de la administración y con el transcurso del tiempo. La sangre recogida se centrifugó de inmediato durante 15 minutos a 15.000 rpm y 4 °C para obtener plasma. El plasma separado se almacenó en un congelador configurado a -20 °C o menos hasta que se realizaron las mediciones.

20 La medición de la concentración en plasma de mono cynomolgus se realizó mediante ELISA. En primer lugar, se suministró IgG anti-humano (específico de cadena γ) fragmento F(ab')₂ de anticuerpo (Sigma) en un Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International) y se dejó reposar sin alteración durante la noche a 4 °C para preparar las placas inmovilizadas con IgG anti-humana. Se prepararon muestras de curva de calibración con concentraciones en plasma de 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2, 0,1 y 0,05 ng/mL y muestras de medición de plasma de mono cynomolgus diluidas 100 veces; se agregaron 200 μ L de 20 ng/mL de IL-6R de mono cynomolgus a 100 μ L de las muestras de curva de calibración y muestras de medición de plasma y luego se dejaron en reposo sin alteración durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se colocaron en la placa inmovilizada con IgG anti-humana y se dejaron en reposo sin alteración durante una hora a temperatura ambiente. El anticuerpo IL-6R anti-humano biotinilado (R&D) se dejó reaccionar durante una hora a temperatura ambiente y luego se dejó reaccionar estreptavidina-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) durante una hora. Se realizó una reacción cromogénica usando TMP One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) como sustrato, luego se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 1N (Showa Chemical) y se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas. Se calcularon las concentraciones en plasma de mono cynomolgus a partir de la absorbancia de la curva de calibración usando el software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). Los periodos de tiempo de las concentraciones en plasma de WT y H3pl/L73 después de la administración intravenosa se muestran en la Fig. 14. Como resultado, se mejoró considerablemente la farmacocinética de H3pl/L73 en comparación con WT en monos cynomolgus de la misma manera que en ratones transgénicos del receptor de IL-6 humano. Dado que se mejoró considerablemente la farmacocinética de un anticuerpo del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH, H3pl/L73, se considera que H3pl/L73 regresa al plasma mediante FcRn como resultado de la disociación del antígeno, el receptor de IL-6 tipo membrana, en condiciones ácidas dentro de los endosomas.

40 A los efectos de evaluar el grado en el que el receptor de IL-6 tipo membrana de mono cynomolgus se neutraliza mediante la administración intravenosa de WT y H3pl/L73, se estudiaron los efectos de los anticuerpos de muestra en la proteína reactiva C (CRP) inducidos en plasma mediante IL-6 de mono cynomolgus. Dado que se secreta CRP cuando IL-6 se une a los receptores de IL-6 tipo membrana, CRP sirve como indicador de la neutralización de los receptores de IL-6 tipo membrana. Se administró IL-6 de mono cynomolgus (cyno.IL-6 preparado en el Ejemplo 1) con plasma de mono cynomolgus inactivado al 1 % por vía subcutánea en la zona lumbar de los animales a diario a 5 μ g/kg del día 3 al día 10 después de la administración de WT o H3pl/L73. Se recogieron muestras de sangre de la vena safena inmediatamente antes del inicio de la administración de IL-6 de mono cynomolgus (día 3) y después de la administración con intervalos de 24 horas (día 4 a día 11), luego se separaron en plasma. Las concentraciones de CRP de animales individuales se midieron con Cias R CRP (Kanto Chemical) usando un analizador automático (TBA-120FR, Toshiba Medical Systems). Los periodos de tiempo de la concentración de CRP luego de la inducción con IL-6 de mono cynomolgus con respecto a WT y H3pl/L73 se muestran en la Fig. 15. Como resultado, se prolongó considerablemente la duración de la supresión de CRP mediante H3pl/L73 en comparación con WT. En virtud de este descubrimiento, se cree que un anticuerpo del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH, H3pl/L73, regresa al plasma mediante FcRn como resultado de la disociación de su antígeno, el receptor de IL-6 tipo membrana, en condiciones ácidas dentro de los endosomas, y neutraliza el receptor de IL-6 tipo membrana mediante la re-unión a este y suprime así la producción de CRP durante un periodo de tiempo más prolongado que WT. Dicho de otro modo, se demostró que H3pl/L73 puede unirse a y neutralizar el receptor de IL-6 tipo membrana más de una vez, como una única molécula de anticuerpo. Dado que se prolonga la duración de la supresión de la producción de CRP mediante H3pl/L73 en comparación con la duración mediante WT, se indicó que se prolonga la duración de tiempo en que un antígeno, el receptor de IL-6 tipo membrana, se une con los anticuerpos para H3pl/L73 en comparación con WT.

A los efectos de evaluar el grado en el que el receptor de IL-6 soluble de mono cynomolgus se neutraliza mediante la administración intravenosa de WT y H3pl/L73, se midió la concentración de receptor de IL-6 soluble de mono cynomolgus no unido en plasma de mono cynomolgus. Todos los anticuerpos tipo IgG (IgG de mono cynomolgus, anticuerpo del receptor de IL-6 anti-humano, y un complejo del anticuerpo del receptor de IL-6 anti-humano y receptor de IL-6 soluble de mono cynomolgus) presentes en el plasma se absorbieron en la proteína A mediante adición de 30 (J.L de plasma de mono cynomolgus a una cantidad apropiada de resina de proteína A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) secada en un recipiente de filtro de 0,22 µm (Millipore). Después de la agitación con una centrífuga a alta velocidad, se recuperó la solución que se pasó a través de esta (denominada en lo sucesivo "solución de paso"). Dado que la solución de paso no contiene el complejo del anticuerpo del receptor de IL-6 anti-humano y el receptor de IL-6 soluble de mono cynomolgus que se une a la proteína A, se puede medir la concentración del receptor de IL-6 soluble no unido midiendo la concentración del receptor de IL-6 soluble de mono cynomolgus en la solución de paso. Se mezclaron anticuerpo IL-6R anti-humano monoclonal (R&D) etiquetado con rutenio con éster de NHS sulfo-etiquetado (Meso Scale Discovery) y anticuerpo de IL-6R anti-humano biotinilado (R&D) con muestras de curva de calibración del receptor de IL-6 de mono cynomolgus ajustadas a concentraciones de 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125 y 62,5 pg/mL y las muestras de plasma se trataron con proteína A como se describió anteriormente. Se dejó que las mezclas reaccionaran durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocaron las mezclas en una placa de 96 pocillos MA2400 estándar recubierta con SA (Meso Scale Discovery). Después de dejarlo reaccionar durante una hora adicional y de lavarlo, se colocó amortiguador Read T (x4) (Meso Scale Discovery). Inmediatamente después, se realizó la medición con Sector Imager 2400 (Meso Scale Discovery). Se calcularon las concentraciones del receptor de IL-6 de mono cynomolgus a partir de la respuesta de la curva de calibración usando el software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). Los periodos de tiempo de las concentraciones del receptor de IL-6 soluble de mono cynomolgus no unido para WT y H3pl/L73 se muestran en la Fig. 16. Como resultado, la duración de la neutralización del receptor de IL-6 soluble de mono cynomolgus mediante H3pl/L73 fue considerablemente mayor en comparación con la duración mediante WT. En virtud de este descubrimiento, se cree que el anticuerpo del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH H3pl/L73 se disocia de su antígeno, el receptor de IL-6 soluble, en condiciones ácidas en endosomas, y regresa al plasma mediante FcRn; y se une a y neutraliza el receptor de IL-6 soluble nuevamente. Dado que se prolonga la duración de la supresión del receptor de IL-6 soluble de mono cynomolgus no unido mediante H3pl/L73 en comparación con la duración mediante WT, se indicó que se prolonga la duración de tiempo en que un antígeno, el receptor de IL-6 soluble, se une con los anticuerpos para H3pl/L73 en comparación con WT.

A partir de estos descubrimientos, se descubrió que el tiempo hasta que el anticuerpo desaparece del plasma, así como el tiempo en el que los receptores de IL-6 solubles y tipo membrana se unen con los anticuerpos en el cuerpo es considerablemente mayor para los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH que se unieron más firmemente al antígeno a pH 7,4, que es el pH en el plasma, pero se unen más débilmente al antígeno a pH 5,8, que es el pH dentro de los endosomas, en comparación con el anticuerpo del receptor de anti-IL-6 de tipo silvestre. Esto hace posible reducir la dosificación y frecuencia de administración a los pacientes y, como consecuencia, la dosificación de administración total. Por lo tanto, se cree que el anticuerpo del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH es particularmente ventajoso como agente farmacéutico para su uso como antagonista de IL-6.

[Ejemplo 10] Mejora de la unión dependiente del pH al receptor de IL-6 tipo membrana mediante optimización de la región variable

Optimización de regiones variables H3pl/L73 y CLH5/L82

Los anticuerpos con capacidades de unión dependiente del pH superiores demostraron efectos superiores en el Ejemplo 9. Por lo tanto, para mejorar adicionalmente las capacidades de unión dependiente del pH, se introdujeron mutaciones en la secuencia de CDR de CLH5 obtenido en el Ejemplo 3 para construir VH1-IgG1 (SEQ ID NO: 21) y VH2-IgG1 (SEQ ID NO: 22). Además, se introdujeron mutaciones en la secuencia marco y en la secuencia de CDR de H3pl para construir las cadenas H modificadas VH3-IgG1 (SEQ ID NO: 23) y VH4-IgG1 (SEQ ID NO: 24). Se introdujeron mutaciones en las secuencias de CDR de L73 y L82 para construir las cadenas L modificadas VL1-CK (SEQ ID NO: 25), VL2-CK (SEQ ID NO: 26) y VL3-CK (SEQ ID NO: 27). Más específicamente, se construyeron mutantes usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange (Stratagene) de acuerdo con el método descrito en las instrucciones adjuntas, y se insertaron los fragmentos de plásmido resultantes en un vector de expresión celular de mamífero para construir los vectores de expresión de cadena H y los vectores de expresión de cadena L deseados. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de los vectores de expresión resultantes mediante los métodos conocidos por las personas expertas en la técnica.

El anticuerpo con VH2-IgG1 (SEQ ID NO: 22) como cadena H y VL2-CK (SEQ ID NO: 26) como cadena L se denominó Fv1-IgG1, el anticuerpo con VH1-IgG1 (SEQ ID NO: 21) como cadena H y L82 como cadena L se denominó Fv2-IgG1, el anticuerpo con VH4-IgG1 (SEQ ID NO: 24) como cadena H y VL1-CK (SEQ ID NO: 25) como cadena L se denominó Fv3-IgG1, el anticuerpo con VH3-IgG1 (SEQ ID NO: 23) como cadena H y VL3-CK (SEQ ID NO: 27) como cadena L se denominó Fv4-IgG1. De estos, se expresaron y purificaron Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1. La expresión y purificación se realizó mediante el método que se describe en el Ejemplo 1.

Análisis de la unión de los clones de unión dependiente del pH al receptor de IL-6 soluble

Los análisis cinéticos de las reacciones antígeno-anticuerpo a pH 7,4 se realizaron en los cuatro tipos de anticuerpos, es decir, el anticuerpo PM1 humanizado (tipo silvestre: WT), y WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1 construidos en los Ejemplos 2 y 10 con Biacore T100 (GE Healthcare) (amortiguador: 10 mM de MES (pH 7,4), 150 mM de NaCl, Tween 20 al 0,05 %). Cada anticuerpo se unió a un chip sensor en el que se inmovilizó el F(ab)2 de cadena específica y anti-IgG (Pierce) mediante acoplamiento de amina y luego se inyectó SR344 ajustado a una concentración de 9,8 a 40 nM allí como analito. Se observaron la asociación y disociación de SR344 en tiempo real para los clones de unión dependiente del pH. Todas las mediciones se realizaron a 37 °C. Se calcularon las constantes de velocidad de asociación k_a (1/Ms), las constantes de velocidad de disociación k_d (1/s) usando Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare), y las constantes de disociación KD (M) en función de estos valores (Tabla 7).

[Tabla 7] Comparación de constantes de velocidad de disociación de los clones de unión dependiente del pH del receptor de IL-6 soluble, SR344

Muestra	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
WT	4, 0E+05	1, 1E-03	2, 7E-09
H3pl/L73	4, 1E+05	5, 9E-04	1, 4E-09
Fv2-IgG1	3, 9E+05	7, 7E-04	2, 0E-09
Fv4-IgG1	7, 2E+05	1, 0E-03	1, 4E-09

Como resultado de calcular la afinidad a pH 7,4 para cada clon, las constantes de disociación (afinidad, valor KD) de WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1, y Fv4-IgG1 con SR344 fueron, respectivamente, 2,7 nM, 1,4 nM, 2,0 nM y 1,4 nM, y son casi equivalentes. Se demostró que Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1 presentaron capacidad de unión al receptor de IL-6 soluble que es igual o superior a la capacidad de WT.

Análisis de la unión de los clones de unión dependiente del pH al receptor de IL-6 tipo membrana

Se observaron reacciones antígeno-anticuerpo al receptor de IL-6 tipo membrana a pH 5,8 y pH 7,4 para los cuatro tipos de clones construidos, WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1 con Biacore T100 (GE Healthcare). Se evaluó la unión al receptor de IL-6 tipo membrana evaluando la unión al receptor de IL-6 inmovilizado en un chip sensor. Se biotiniló SR344 de acuerdo con un método conocido por las personas expertas en la técnica y el SR344 biotinilado se inmovilizó en el chip sensor mediante estreptavidina mediante el uso de la afinidad entre estreptavidina y biotina. Todas las mediciones se realizaron a 37 °C.

El amortiguador de fase móvil fue 10 mM de MES (pH 5,8), 150 mM de NaCl y Tween 20 al 0,05 %. Se inyectaron los clones de unión dependiente del pH allí en condiciones de pH 7,4 y se permitió que se unieran a SR344 (amortiguador de muestra de inyección: 10 mM de MES (pH 7,4), 150 mM de NaCl, Tween 20 al 0,05 %), luego se observó la disociación dependiente del pH de cada clon a pH de fase móvil de 5,8 (Fig. 17).

Se ajustaron las concentraciones de la muestra a 0,25 µg/mL. La unión se realizó en 10 mM de MES (pH 7,4), 150 mM de NaCl y Tween 20 al 0,05 %. La disociación se realizó en 10 mM de MES (pH 5,8), 150 mM de NaCl y Tween 20 al 0,05 %. En este caso, se calcularon las constantes de velocidad de disociación (k_d (1/s)) a pH 5,8 ajustando solamente la fase de disociación a pH 5,8 con Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare). De manera similar, las concentraciones de la muestra se ajustaron a 0,25 µg/mL, la unión se realizó en 10 mM de MES (pH 7,4), 150 mM de NaCl, y Tween 20 al 0,05 %, se realizó la disociación en 10 mM de MES (pH 7,4), 150 mM de NaCl y Tween 20 al 0,05 %, y se calcularon las constantes de velocidad de disociación (k_d (1/s)) a pH 7,4 ajustando solamente la fase de disociación a pH 7,4 con Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare). Las constantes de velocidad de disociación dependiente del pH de cada clon se muestran en la Tabla 8.

[Tabla 8] Comparación de constantes de la velocidad de disociación de los clones de unión dependiente del pH del receptor de IL-6 tipo membrana, SR344

Muestra	pH7.4 k_d (1/s)	pH5.8 k_d (1/s)	Dependencia del pH $k_d(\text{pH}5.8)/k_d(\text{pH}7.4)$
WT	2.5E-04	2.5E-04	1.00
H3pl/L73	2.6E-04	6.7E-04	2.59
Fv2-IgG1	3.4E-04	2.4E-03	7.18
Fv4-IgG1	4.7E-04	2.6E-03	5.56

Como resultado de calcular la dependencia del pH para cada clon, las dependencias del pH de unión al receptor de

IL-6 tipo membrana de los cuatro clones, WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1 con respecto a SR344 fueron de 1,0 veces, 2,59 veces, 7,18 veces y 5,56 veces, respectivamente. Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1 demostraron mayor dependencia del pH en disociación del receptor de IL-6 tipo membrana que H3pl/L73-IgG1.

5 En virtud de lo que antecede, se demostró que Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1 presentan mayor unión dependiente del pH al receptor de IL-6 que H3pl/L73-IgG1 a la vez que mantiene la afinidad con el receptor de IL-6 soluble igual o superior a la de WT.

[Ejemplo 11] Prueba de PK/PD de anticuerpos de unión dependiente del pH con regiones variables optimizadas usando ratones transgénicos del receptor de IL-6 humano

10 Se evaluó la farmacocinética de Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1, así como WT y H3pl/L73-IgG1 preparados y evaluados en el Ejemplo 10 con ratones transgénicos del receptor de IL-6 humano utilizados en el Ejemplo 8. Se administró WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1 o Fv4-IgG1 mediante administración intravenosa de dosis única a ratones transgénicos de hIL-6R a 25 mg/kg, y se midió la concentración de cada anticuerpo en el plasma de la misma manera que en el Ejemplo 8. Los períodos de tiempo de las concentraciones en plasma de WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1 se muestran en la Fig. 18.

15 La farmacocinética de H3pl/L73-IgG1 mejoró en comparación con WT de la misma manera que en el Ejemplo 8, mientras que la farmacocinética de Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1 mejoró aun más que H3pl/L73-IgG1. La medición con respecto a las concentraciones del receptor de IL-6 no unido, según se midieron en monos cynomolgus en el Ejemplo 9, se realizó en los ratones transgénicos de hIL-6R en esta prueba con el mismo método. Como resultado, se confirmó la prolongación de la duración de la neutralización del receptor de IL-6 soluble para Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1 en comparación con la de H3pl/L73-IgG1 (no se muestran los datos). Como se indica en el Ejemplo 10, se mejoró la unión dependiente del pH al receptor de IL-6 tipo membrana para Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1 en comparación con H3pl/L73-IgG1. Por lo tanto, se indicó que la mejora adicional de la farmacocinética y la duración de la neutralización del receptor de IL-6 soluble con respecto a la de H3pl/L73-IgG1 es posible mediante la mejora de la unión dependiente del pH al receptor de IL-6 tipo membrana.

25 [Ejemplo 12] Mejora de la unión dependiente del pH al receptor de IL-6 tipo membrana mediante optimización de la región constante Optimización de la región constante de Fv4-IgG1

30 En general, se ha indicado que la unión a los antígenos unidos a la membrana varía dependiendo de la región constante del anticuerpo (J. Immunol. Methods 23 junio 1997; 205(1): 67-72). Las regiones constantes de los anticuerpos de unión dependiente del pH preparadas anteriormente fueron del isotipo de IgG1. Por lo tanto, se realizó un estudio para la optimización de la región constante a los efectos de mejorar la unión dependiente del pH al receptor de IL-6 tipo membrana.

Se introdujo una mutación en una región constante de origen natural, es decir, región constante IgG2 (SEQ ID NO: 28) para construir la región constante IgG2AGK (SEQ ID NO: 29).

35 Se introdujo otra mutación en la región constante IgG2AGK para construir la región constante M58 (SEQ ID NO: 30). Se introdujo además mutaciones en las regiones constantes IgG2 y M58 para construir las regiones constantes M71 (SEQ ID NO: 31) y M73 (SEQ ID NO: 32).

40 Se construyó VH3-IgG2AGK (SEQ ID NO: 33) mediante la sustitución de la región constante de VH3-IgG1 preparado en el Ejemplo 10 con IgG2AGK, se construyó VH3-M58 (SEQ ID NO: 34) mediante la sustitución de la región constante con M58 y se construyó VH3-M73 (SEQ ID NO: 35) mediante la sustitución de la región constante con M73. Más específicamente, se construyeron vectores de expresión en los que la parte de región constante de VH3 usado en el Ejemplo 10 se sustituyó con una región constante deseada mediante digestión y ligación de NheI/NotI. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de los vectores de expresión resultantes usando un método conocido por las personas expertas en la técnica.

45 Se llevó a cabo la expresión y purificación de los siguientes: Fv4-IgG2 con VH3-IgG2AGK (SEQ ID NO: 33) para la cadena H y VL3-CK (SEQ ID NO: 27) para la cadena L; Fv4-M58 con VH3-M58 (SEQ ID NO: 34) para la cadena H y VL3-CK (SEQ ID NO: 27) para la cadena L; y Fv4-M73 con VH3-M73 (SEQ ID NO: 35) para la cadena H y VL3-CK (SEQ ID NO: 27) para la cadena L. La expresión y purificación se realizó mediante el método que se describe en el Ejemplo 1.

Análisis de la unión de Fv4 con región constante optimizada al receptor de IL-6 soluble

50 Se observó asociación con y disociación de SR344 en tiempo real con el mismo método que en el Ejemplo 10 para Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 y Fv4-M73 preparado de dicha forma, así como WT. Se calcularon las constantes de velocidad de asociación k_a (1/Ms) y las constantes de velocidad de disociación k_d (1/s) después del análisis de la misma manera y luego se calcularon las constantes de disociación KD (M) en función de estos valores (Tabla 9).

[Tabla 9] Comparación de constantes de velocidad de disociación de los clones de unión dependiente del pH del receptor de IL-6 soluble, SR344

Muestra	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
Fv4-IgG1	7,2E+05	1,0E-03	1,4E-09
Fv4-IgG2	9,6E+05	1,2E-03	1,3E-09
Fv4-M58	8,3E+05	1,1E-03	1,4E-09
Fv4-M73	7,5E+05	1,0E-03	1,4E-09

5 Como resultado de calcular la afinidad a pH 7,4 para cada clon, las constantes de disociación (afinidad, valor KD) de Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 y Fv4-M73 a SR344 fueron de 1,4 nM, 1,3 nM, 1,4 nM y 1,4 nM, respectivamente, y son casi equivalentes. Esto indica que la capacidad de unión de los clones de unión dependiente del pH al receptor de IL-6 soluble, SR344, no cambia incluso después de modificar la región constante. En virtud de este descubrimiento, se cree que la capacidad de unión al receptor de IL-6 soluble no cambia para Fv1, Fv2 y Fv3 incluso si la región constante se modificó de manera similar.

10 Análisis de la unión de Fv4 con región constante optimizada al receptor de IL-6 tipo membrana

Se observaron reacciones antígeno-anticuerpo al receptor de IL-6 tipo membrana a pH 5,8 y pH 7,4 para Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 y Fv4-M73 preparados de dicha forma, así como WT, de la misma manera que en el Ejemplo 10 con Biacore T100 (GE Healthcare). Se muestran los resultados obtenidos mediante la inyección de los clones de unión dependiente del pH en condiciones de pH 7,4 para permitir la unión a SR344, y mediante observación de la disociación dependiente del pH de cada clon en la fase móvil de pH 5,8, en la Fig. 19. Se realizaron análisis adicionales de la misma manera que en el Ejemplo 10 y las velocidades de disociación dependiente del pH para cada clon se muestran en la Tabla 10.

[Tabla 10] Comparación de las constantes de velocidad de disociación de los clones de unión dependiente del pH del receptor de IL-6 tipo membrana, SR344

Muestra	pH7.4 kd (1/s)	pH5.8 kd (1/s)	Dependencia del pH kd(pH5.8)/kd(pH7.4)
Fv4-IgG1	4,7E-04	2,6E-03	5,56
Fv4-IgG2	1,0E-03	1,8E-02	16,99
Fv4-M58	5,4E-04	9,5E-03	17,64
Fv4-M73	5,1E-04	5,1E-03	10,00

20 Como resultado de calcular la dependencia del pH para cada clon, las dependencias del pH de Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 y Fv4-M73 a SR344 fueron 5,6 veces, 17,0 veces, 17,6 veces y 10,1 veces, respectivamente; por lo tanto, Fv4-IgG2, Fv4-M58 y Fv4-M73 demostraron mayor disociación dependiente del pH del receptor de IL-6 tipo membrana que Fv4-IgG1.

25 En función de los resultados de analizar la unión al receptor de IL-6 soluble y la unión al receptor de IL-6 tipo membrana usando la región variable de Fv4, se descubrió que la sustitución de la región constante de IgG1 a IgG2, M58, o M73 podría mejorar la unión dependiente del pH al receptor de IL-6 tipo membrana sin provocar un cambio en la afinidad con el receptor de IL-6 soluble. Se consideró que esto se mantiene de manera similar para Fv1, Fv2 y Fv3.

30 [Ejemplo 13] Prueba de PK/PD de anticuerpos de unión dependiente del pH con región constante optimizada usando ratones transgénicos del receptor de IL-6 humano

35 Se evaluó la farmacocinética de Fv4-IgG1, Fv4-IgG2 y Fv4-M58 preparados en el Ejemplo 13 con los ratones transgénicos del receptor de IL-6 humano (ratones transgénicos de hIL-6R) usados en el Ejemplo 8 para examinar los efectos de la región constante en la farmacocinética. Se administró WT, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2 o Fv4-M58 a los ratones transgénicos de hIL-6R mediante administración intravenosa de dosis única a 25 mg/kg, y luego se realizó la medición de las concentraciones en plasma de cada anticuerpo de la misma manera que en el Ejemplo 8. Los periodos de tiempo de las concentraciones en plasma de WT, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2 y Fv4-M58 se muestran en la Fig. 20.

40 De manera similar al Ejemplo 11, se mejoró la farmacocinética de Fv4-IgG1 en comparación con WT y se mejoró aun más la farmacocinética de Fv4-IgG2 y Fv4-M58 en comparación con Fv4-IgG1. La medición con respecto a las concentraciones del receptor de IL-6 no unido, según se midieron en monos cynomolgus en el Ejemplo 9, se realizó en los ratones transgénicos de hIL-6R en esta prueba con el mismo método. Como resultado, se confirmó la prolongación de la duración de la neutralización del receptor de IL-6 soluble para Fv4-IgG2 y Fv4-M58 en

comparación con la de Fv4-IgG1 (no se muestran los datos). Como se indica en el Ejemplo 10, se mejoró la unión dependiente del pH al receptor de IL-6 tipo membrana para Fv4-IgG2 y Fv4-M58 en comparación con Fv4-IgG1. Por lo tanto, se demostró que la mejora de la unión dependiente del pH al receptor de IL-6 tipo membrana y la mejora de la farmacocinética y la duración de la neutralización del receptor de IL-6 soluble son posibles al sustituir la región constante de IgG1 con IgG2 o M58. En función de este descubrimiento, se cree que la farmacocinética y duración de la neutralización del receptor de IL-6 soluble, no solamente en el caso de Fv4, sino también en el caso de Fv1, Fv2 y Fv3, pueden mejorar en comparación con IgG1 al sustituir la región constante de IgG1 con IgG2 o M58.

[Ejemplo 14] Construcción de anticuerpos de unión dependiente del pH con regiones variables y constantes optimizadas

10 Se construyeron VH2-M71 (SEQ ID NO: 36) y VH2-M73 (SEQ ID NO: 37), con M71 y M73 para la región constante de VH2-IgG1, y VH4-M71 (SEQ ID NO: 38) y VH4-M73 (SEQ ID NO: 39), con M71 y M73 para la región constante de VH4-IgG1, mediante el mismo método que se describió anteriormente.

15 Se purificaron y expresaron Fv1-M71 con VH2-M71 para la cadena H y VL2-CK para la cadena L, Fv1-M73 con VH2-M73 para la cadena H y VL2-CK para la cadena L, Fv3-M71 con VH4-M71 para la cadena H y VL1-CK para la cadena L y Fv3-M73 con VH4-M73 para la cadena H y VL1-CK para la cadena L. La expresión y purificación se realizó mediante el método que se describe en el Ejemplo 1.

Análisis de la unión de los anticuerpos de unión dependiente del pH con regiones variables y constantes optimizadas al receptor de IL-6 soluble

20 Se observó la asociación a y disociación de SR344 en tiempo real con el mismo método que en el Ejemplo 10 para once tipos de anticuerpos, anticuerpo PM1 humanizado (tipo silvestre: WT) y H3pI/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M71, Fv3-M73, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 y Fv4-M73, construidos como se describió anteriormente. Se calcularon las constantes de velocidad de asociación k_a (1/Ms) y las constantes de velocidad de disociación k_d (1/s) mediante análisis de la misma manera y se calcularon las constantes de disociación KD (M) en función de estos valores (Tabla 11).

25 [Tabla 11] Comparación de constantes de velocidad de disociación de los clones de unión dependiente del pH del receptor de IL-6 soluble, SR344

Muestra	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
WT	4,0E+05	1,1E-03	2,7E-09
H3pI/L73	4,1E+05	5,9E-04	1,4E-09
Fv1-M71	5,5E+05	5,4E-04	9,7E-10
Fv1-M73	6,1E+05	5,5E-04	9,1E-10
Fv2-IgG1	3,9E+05	7,7E-04	2,0E-09
Fv3-M71	7,8E+05	8,2E-04	1,1E-09
Fv3-M73	8,5E+05	8,7E-04	1,0E-09
Fv4-IgG1	7,2E+05	1,0E-03	1,4E-09
Fv4-IgG2	9,6E+05	1,2E-03	1,3E-09
Fv4-M58	8,3E+05	1,1E-03	1,4E-09
Fv4-M73	7,5E+05	1,0E-03	1,4E-09

Se descubrió que los diez tipos de clones de unión dependiente del pH resultantes presentan constantes de disociación (afinidad, valores KD) con el receptor de IL-6 soluble iguales o superiores a las de WT.

30 Análisis de la unión de los anticuerpos de unión dependiente del pH con regiones variables y constantes optimizadas al receptor de IL-6 tipo membrana

35 Se observaron reacciones antígeno-anticuerpo con el receptor de IL-6 tipo membrana a pH 5,8 y pH 7,4 de la misma manera que en el Ejemplo 10 con Biacore T100 (GE Healthcare) para los once tipos de anticuerpos, anticuerpo PM1 humanizado (tipo silvestre: WT) and H3pI/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M71, Fv3-M73, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 y Fv4-M73, preparados como se describió anteriormente. Se inyectaron clones de unión dependiente del pH en condiciones de pH 7,4 para permitirles unirse a SR344 y luego se observó la disociación dependiente del pH de cada clon a pH de la fase móvil, pH 5,8. Los resultados se muestran en la Fig. 21 (los resultados para Fv1-M71, Fv1-M73, Fv3-M71 y Fv3-M73 se muestran en la Fig. 21, mientras que los resultados para otros clones se muestran en las Figs. 17 y 19). Los análisis se realizaron de la misma manera que en el Ejemplo 10

y las dependencias del pH de las constantes de velocidad de disociación de los once tipos de clones se muestran en la Tabla 12.

[Tabla 12] Dependencias del pH de las constantes de velocidad de disociación de los clones de unión dependiente del pH del receptor de IL-6 tipo membrana, SR344

Muestra	pH7.4 kd (1/s)	pH5.8 kd (1/s)	Dependencia del pH kd(pH5,8)/kd(pH7,4)
WT	2,5E-04	2,5E-04	1,00
H3pl/L73	2,6E-04	6,7E-04	2,59
Fv1-M71	6,1E-04	6,9E-03	11,29
Fv1-M73	3,7E-04	3,2E-03	8,80
Fv2-IgG1	3,4E-04	2,4E-03	7,18
Fv3-M71	9,1E-04	9,7E-03	10,74
Fv3-M73	4,9E-04	5,3E-03	10,88
Fv4-IgG1	4,7E-04	2,6E-03	5,56
Fv4-IgG2	1,0E-03	1,8E-02	16,99
Fv4-M58	5,4E-04	9,5E-03	17,64
Fv4-M73	5,1E-04	5,1E-03	10,06

5

Los diez tipos de clones de unión dependiente del pH obtenidos demostraron mejor capacidad de unión dependiente del pH al receptor de IL-6 tipo membrana. Además, se descubrió que Fv1 -M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M71, Fv3-M73, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 y Fv4-M73 demostraron capacidad de unión dependiente del pH al receptor de IL-6 tipo membrana en comparación con H3pl/L73-IgG1, para el cual se descubrió que el tiempo hasta que el anticuerpo desaparece del plasma, así como el tiempo en el que el receptor de IL-6 soluble y el receptor de IL-6 tipo membrana se encuentran unidos con el anticuerpo en el cuerpo se prolongan considerablemente en comparación con WT, como se muestra en monos cynomolgus en el Ejemplo 9.

10

[Ejemplo 15] Prueba de PK/PD de anticuerpos de unión dependiente del pH con regiones variables y constantes optimizadas usando monos cynomolgus

15

Construcción de anticuerpo del receptor de anti-IL-6 de alta afinidad conocido

Se construyó un vector de expresión celular de mamífero para expresar el anticuerpo del receptor de anti-IL-6 de alta afinidad VQ8F11-21 hlgG1 que se describe en US 2007/0280945 A1 (US 2007/0280945 A1, secuencia de aminoácidos 19 y 27), como un anticuerpo del receptor de anti-IL-6 de alta afinidad conocido. Se construyó una región variable de anticuerpo mediante PCR combinando oligo-ADN sintéticos (conjunto de PCR). Se amplificó la región constante mediante PCR del vector de expresión utilizado en el Ejemplo 1. Se ligaron la región variable del anticuerpo y la región constante del anticuerpo mediante conjunto de PCR y se insertaron en un vector para expresión en mamíferos. Se insertaron los fragmentos de ADN de cadena H y cadena L resultantes en vectores de expresión celular de mamífero para construir el vector de expresión de cadena H y el vector de expresión de cadena L de interés. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de los vectores de expresión resultantes mediante un método conocido por las personas expertas en la técnica. Se llevó a cabo la expresión y purificación usando los vectores de expresión construidos. Se llevó a cabo la expresión y purificación con el método descrito en el Ejemplo 1 para obtener el anticuerpo del receptor de anti-IL-6 de alta afinidad (Ab de alta afinidad).

20

25

Prueba de PK/PD en monos cynomolgus

Se evaluaron la farmacocinética y la eficacia farmacológica en monos cynomolgus para los anticuerpos de unión dependiente del pH H3pl/L73-IgG1 y Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73 y Fv4-M73 y el anticuerpo del receptor de anti-IL-6 de alta afinidad conocido (Ab de alta afinidad). Se administró H3pl/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73 o Fv4-M73 a monos cynomolgus mediante administración intravenosa de dosis única a 0,5 mg/kg, mientras que el Ab de alta afinidad se administró mediante administración intravenosa de dosis única a 1,0 mg/kg. Se recogieron muestras de sangre antes de la administración y con el transcurso del tiempo. La concentración en plasma de cada anticuerpo se midió de la misma manera que en el Ejemplo 9. Los periodos de tiempo de las concentraciones en plasma de H3pl/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73 y Fv4-M73, así como el Ab de alta afinidad se muestran en la Fig. 21. A los efectos de evaluar la eficacia farmacológica en términos del grado en que se neutraliza el receptor de IL-6 tipo membrana de mono cynomolgus, se administró IL-6 de mono cynomolgus por vía subcutánea en la zona lumbar de los animales a diario a 5 mg/kg desde el día 3 hasta el día 10 (desde el día 6 hasta el día 10 con respecto al Ab de alta afinidad) después de la administración del anticuerpo, de la misma manera que en el Ejemplo 9. La concentración de CRP de cada animal se midió 24 horas después de cada administración. Los periodos de tiempo de las concentraciones de CRP con la administración de cada anticuerpo se

35

40

muestran en la Fig. 22. A los efectos de evaluar la eficacia farmacológica en términos del grado de neutralización del receptor de IL-6 soluble de monos cynomolgus, se midió la concentración del receptor de IL-6 soluble de mono cynomolgus no unido en plasma de mono cynomolgus de la misma manera que en el Ejemplo 9. Los periodos de tiempo de las concentraciones del receptor de IL-6 soluble de mono cynomolgus no unido con la administración de cada anticuerpo se muestran en la Fig. 23.

Como resultado, se mantuvieron altas las concentraciones de anticuerpo en plasma para cada uno de Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73 y Fv4-M73 en comparación con H3pl/L73-IgG1, mientras que las concentraciones de CRP y el receptor de IL-6 soluble de mono cynomolgus no unido se mantuvieron en niveles bajos. A saber, este resultado demostró que el tiempo en el que los receptores de IL-6 soluble y tipo membrana se encuentran unidos con el anticuerpo (o dicho de otro modo, la duración de la neutralización) se prolongó con los anticuerpos en comparación con H3pl/L73-IgG1.

Además, se confirmaron estos anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH para sus efectos de neutralización y eficacia sostenida igual o superior a la del anticuerpo del receptor de anti-IL-6 de alta afinidad conocido (Ab de alta afinidad) administrado a 1,0 mg/kg a simplemente la mitad de la dosis de este, es decir, a 0,5 mg/kg. Por lo tanto, se dilucidó que los anticuerpos de unión dependiente del pH presentan efectos de neutralización y eficacia sostenida superior a los del anticuerpo del receptor de anti-IL-6 de alta afinidad conocido.

También se ha confirmado que los anticuerpos que se muestran en la Tabla 12 para los que no se realizaron pruebas de Pk/PD usando monos cynomolgus como en esta prueba, demuestran unión dependiente del pH al receptor de IL-6 tipo membrana en comparación con H3pl/L73-IgG1. Por lo tanto, también se cree que el tiempo durante el cual el receptor de IL-6 tipo membrana y soluble se encuentra unido con los anticuerpos (o, dicho de otro modo, la duración de los efectos de neutralización y neutralización sostenida) se prolongan para los anticuerpos en comparación con H3pl/L73-IgG1.

En el Ejemplo 9, para H3pl/L73-IgG1, se descubrió que el tiempo hasta que el anticuerpo desaparece del plasma, así como el tiempo en el que el receptor de IL-6 soluble y el receptor de IL-6 tipo membrana se encuentran unidos con el anticuerpo en el cuerpo (efectos de neutralización sostenida) se prolongan considerablemente en comparación con WT. Por lo tanto, se cree que Fv1-M7i, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M71, Fv3-M73, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58 y Fv4-M73, con efectos de neutralización sostenida superiores que H3pl/L73-IgG1, tienen efectos de neutralización sostenida notoriamente mejores en comparación con WT.

A diferencia de los anticuerpos del receptor de anti-IL-6, los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH que se unen firmemente al antígeno al pH del plasma de pH 7,4 pero se unen solo débilmente al antígeno al pH de los endosomas de pH 5,8, hacen posible la reducción de la dosificación y frecuencia de administración al paciente del anticuerpo del receptor de anti-IL-6 y, como resultado, pueden reducir considerablemente la cantidad de administración total. Por lo tanto, se cree que los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 de unión dependiente del pH son extremadamente superiores como agente farmacéutico para su uso como antagonista de IL-6.

[Ejemplo 16] Construcción de anticuerpo anti-IL-6 de unión dependiente del pH

Expresión y purificación del anticuerpo anti-IL-6

En los Ejemplos 1 a 15, se crearon satisfactoriamente varios anticuerpos del receptor de anti-IL-6 humanizado que se unen de manera dependiente del pH al receptor de IL-6 otorgando la dependencia a través de la introducción de sustituciones de histidina y similares en la región variable, en particular, las secuencias de CDR de los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 humanizado. Se descubrió que todos estos anticuerpos se unen de forma reiterada al receptor de IL-6 y demuestran una mejora considerable de la PK/PD.

Por lo tanto, se confirmó que la capacidad dependiente del pH de un anticuerpo de unirse a un antígeno podría otorgarse a otro anticuerpo que se une a un antígeno distinto del receptor de IL-6 mediante un método similar. Se seleccionó IL-6 humano como antígeno, y se construyó un anticuerpo anti-IL-6 que incluye la cadena H (WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 62) y la cadena L (WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 63), que se une a IL-6 como se describe en WO 2004/039826, ("Anti-IL6 de tipo silvestre"). Mediante un método conocido por los expertos en la técnica, se insertaron fragmentos de genes que codifican las secuencias de aminoácidos del anticuerpo de interés en vectores de expresión celular de mamífero para construir el vector de expresión de cadena H y el vector de expresión de cadena L de interés. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de los vectores de expresión resultantes usando un método conocido por un experto en la técnica. Se expresó y purificó anti-IL6 de tipo silvestre mediante el método que se describe en el Ejemplo 1.

Construcción del anticuerpo anti-IL-6 dependiente del pH

A los efectos de otorgar capacidad dependiente del pH del anticuerpo para unirse a IL-6, se introdujeron sustituciones de histidina en los aminoácidos en CDR del anticuerpo anti-IL-6 (Anti-IL6 de tipo silvestre) que incluye la cadena H (WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 62) y la cadena L (WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 63). Mediante la sustitución de histidina en los aminoácidos de CDR y el posterior análisis, se obtuvieron

varios clones que demuestran la unión dependiente del pH. Se redujo significativamente la unión a pH 5,5 en comparación con la unión a pH 7,4. Las posiciones de sustitución de histidina en los clones dependientes del pH se muestran en la Tabla 13. Los ejemplos incluyen "Anti-IL6 clon 1" que incluye la cadena H (c1) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 64) y la cadena L (c1) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 65) y "Anti-IL-6 clon 2" que incluye la cadena H (cl) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 64) y la cadena L (c1) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 66). Se expresaron y purificaron Anti-IL6 clon 1 y Anti-IL-6 clon 2 mediante el método que se describe en el Ejemplo 1.

[Tabla 13] Posiciones de sustitución de histidina en clones dependientes del pH H32, H59, H61, H99

L53, L54, L90, L94

10 Análisis de la unión de los clones dependientes del pH a IL-6 humano

El análisis cinético de las reacciones entre antígeno y anticuerpo a pH 5,5 y pH 7,4 se realizó usando Biacore T100 (GE Healthcare) en los tres tipos de anticuerpos preparados como se mencionó anteriormente: Anti-IL6 de tipo silvestre, Anti-IL6 clon 1 y Anti-IL-6 clon 2 (amortiguador: DPBS(-) (pH 7,4 o pH 5,5), 150 mM de NaCl). Los anticuerpos se unieron a un chip sensor en el que se inmovilizó la proteína recombinante A7G (Pierce) mediante acoplamiento de amina y luego se inyectó IL-6 humano (Toray) ajustado a una concentración apropiada en el chip como analito. Todas las mediciones se realizaron a 37 °C. Se calcularon las constantes de velocidad de asociación k_a (1/Ms), las constantes de velocidad de disociación k_d (1/s) usando Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare) y las constantes de disociación KD (M) en función de estos valores (Tabla 14). Además, la relación de la afinidad a pH 5,5 y pH 7,4 se calcularon para cada clon para evaluar la unión dependiente del pH.

20 [Tabla 14] Comparación de la unión de los clones dependientes del pH con IL-6

Muestra	pH	$k_a(1/MS)$	$k_d(1/s)$	KD(M)	KD(pH5,5)/KD(pH7,4)
Tipo silvestre	pH7,4	2,05E+07	3,91E-04	1,91E-11	0,8
	pH5,5	1,52E+07	2,45E-04	1,61E-11	
clon 1	pH7,4	1,07E+07	4,71E-03	4,38E-10	10,3
	pH5,5	2,05E+06	9,26E-03	4,52E-09	
clon 2	pH7,4	8,96E+06	2,63E-03	2,94E-10	13,5
	pH5,5	2,76E+06	1,10E-02	3,98E-09	

La relación de afinidad a pH 5,5 y pH 7,4 ($(KD)(pH\ 5,5)/(KD)(pH\ 7,4)$) calculada, que indica la unión dependiente del pH con IL-6 humana, fue 0,8, 10,3 y 13,5 para Anti-IL6 de tipo silvestre, Anti-IL6 clon 1 y Anti-IL6 clon 2, respectivamente. Es decir, la capacidad de unión dependiente del pH de cada clon es más de 10 veces más que la de WT. Los sensogramas de Anti-IL-6 clon 2 a pH 7,4 y pH 5,5 se muestran en la Fig. 26.

Por lo tanto, se demostró que, como en el caso de los anticuerpos del receptor de anti-IL-6, los anticuerpos anti-IL-6 de unión dependiente del pH que se unen al antígeno firmemente en condiciones neutras de plasma, pero débilmente en condiciones ácidas intraendosómicas se pueden construir mediante la introducción de sustituciones de histidina y similares principalmente en las secuencias de aminoácidos CDR. Como se indicó en los Ejemplos 1 a 15, un anticuerpo del receptor de anti-IL-6 que tiene capacidad de unión dependiente del pH se une de forma reiterada al receptor de IL-6 y mejora notoriamente la PK/PD. Es decir, se sugirió que el Anti-IL-6 clon 1 y el Anti-IL-6 clon 2, que tienen capacidad de unión dependiente del pH, se unen de forma reiterada a más antígenos con mejora significativa de la PK/PD, en comparación con Anti-IL6 de tipo silvestre.

[Ejemplo 17] Construcción de anticuerpo del receptor de anti-IL-31 de unión dependiente del pH

35 Expresión y purificación del anticuerpo del receptor de anti-IL-31

En los Ejemplos 1 a 15, se crearon satisfactoriamente varios anticuerpos del receptor de anti-IL-6 humanizado que se unen de manera dependiente del pH al receptor de IL-6 otorgando dependencia del pH mediante la introducción de sustituciones de histidina y similares en la región variable, en particular, las secuencias de CDR de los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 humanizado. Se descubrió que todos estos anticuerpos se unen de forma reiterada al receptor de IL-6 y demuestran una mejora considerable de la PK/PD.

Por lo tanto, se confirmó que la capacidad dependiente del pH de un anticuerpo de unirse a un antígeno podría otorgarse a otro anticuerpo que se une a un antígeno distinto del receptor de IL-6 mediante un método similar. Se seleccionó el receptor de IL-31 de ratón como antígeno, y se construyó un anticuerpo del receptor de anti-IL-31 que incluye la cadena H (WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 67) y la cadena L (WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 68), que se une al receptor de IL-31 de ratón como se describe en WO 2007/142325,

5 (“Anti-IL31R de tipo silvestre”). Mediante un método conocido por los expertos en la técnica, se insertaron fragmentos de genes que codifican las secuencias de aminoácidos de interés en vectores de expresión celular de mamífero para construir el vector de expresión de cadena H y el vector de expresión de cadena L de interés. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de los vectores de expresión resultantes usando un método conocido por un experto en la técnica. Se expresó y purificó anti-IL31R de tipo silvestre mediante el método que se describe en el Ejemplo 1.

Construcción del anticuerpo del receptor de anti-IL-31 dependiente del pH

10 A los efectos de otorgar capacidad dependiente del pH del anticuerpo para unirse al receptor de IL-31, se introdujeron sustituciones de histidina en los aminoácidos de CDR del anticuerpo del receptor de anti-IL-31 (Anti-IL31R de tipo silvestre) que incluye la cadena H (WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 67) y la cadena L (WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 68). Mediante la sustitución de histidina en los aminoácidos de CDR y el posterior análisis, se obtuvieron varios clones que demuestran la unión dependiente del pH. Se redujo significativamente la unión a pH 5,5 en comparación con la unión a pH 7,4. La posición de sustitución de histidina en los clones dependientes del pH se muestra en la Tabla 15. Un ejemplo es “Anti-IL31R clon 1” que incluye la cadena H (c1) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 69) y la cadena L (WT). Se expresó y purificó anti-IL31R clon 1 mediante el método que se describe en el Ejemplo 1.

[Tabla 15] Posición de sustitución de histidina en clones dependientes del pH

H33

20 Análisis de la unión de los clones dependientes del pH al receptor de IL-31 soluble

25 El análisis cinético de las reacciones entre antígeno y anticuerpo a pH 5,5 y pH 7,4 se realizó usando Biacore T100 (GE Healthcare) para los dos tipos de anticuerpos preparados como se mencionó anteriormente: Anti-IL31R de tipo silvestre y Anti-IL31R clon 1 (amortiguador: DPBS(-) (pH 7,4 o pH 5,5), 150 mM de NaCl, Tween 20 al 0,01 %, NaN₃ al 0,02 %). Los anticuerpos se unieron a un chip sensor en el que se inmovilizó la proteína recombinante A/G (Pierce) mediante acoplamiento de amina y luego el receptor de IL-31 de ratón soluble (preparado de acuerdo con el método que se describe en WO 2007/142325) ajustado a una concentración apropiada se inyectó en este como analito. Todas las mediciones se realizaron a 25 °C. Se calcularon las constantes de velocidad de asociación k_a (1/Ms) y las constantes de velocidad de disociación kd (1/s) usando Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare) y las constantes de disociación KD (M) en función de estos valores (Tabla 16). Además, la relación de la afinidad a pH 5,5 y pH 7,4 se calcularon para cada clon para evaluar la unión dependiente del pH.

[Tabla 16] Comparación de la unión de los clones dependientes del pH con el receptor de IL-31 de ratón

Muestra	pH	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	KD(pH5,5)/KD(pH7,4)
Tipo silvestre	pH7,4	1,40E+05	3,40E-03	2,30E-08	3,2
	pH5,5	5,10E+05	3,80E-03	7,40E-08	
clon1	pH7,4	1,70E+05	3,30E-03	2,20E-08	1000,0
	pH5,5	1,10E+03	2,40E-02	2,20E-05	

35 La relación de afinidad a pH 5,5 y pH 7,4 ((KD)(pH 5,5)/(KD)(pH 7,4)) calculada, que indica la unión dependiente del pH con el receptor de IL-31 de ratón, fue 3,2 y 1000 para Anti-IL31R de tipo silvestre y Anti-IL31R clon 1, respectivamente. Es decir, la capacidad de unión dependiente del pH de Anti-IL31R clon 1 es de aproximadamente 300 veces más que la de WT. Los sensogramas de Anti-IL-31R clon 1 a pH 7,4 y pH 5,5 se muestran en la Fig. 27.

40 Por lo tanto, se demostró que, como en el caso de los anticuerpos del receptor de anti-IL-6 y los anticuerpos anti-IL-6, los anticuerpos del receptor de anti-IL-31 de unión dependiente del pH que se unen al antígeno firmemente en condiciones neutras de plasma, pero débilmente en condiciones ácidas intraendosómicas se pueden construir mediante la introducción de sustituciones de histidina y similares principalmente en las secuencias de aminoácidos de CDR. Como se indicó en los Ejemplos 1 a 15, un anticuerpo del receptor de anti-IL-6 que tiene capacidad de unión dependiente del pH se une de forma reiterada al receptor de IL-6 y mejora notoriamente la PK/PD. Es decir, se sugirió que el Anti-IL31R clon 1, que tiene capacidad de unión dependiente del pH, se une de forma reiterada a más antígenos con mejora significativa de la PK/PD, en comparación con Anti-IL31R de tipo silvestre.

45

[Ejemplo 18] Unión reiterada al antígeno con anticuerpo de unión dependiente del pH

Expresión y purificación de anticuerpo administrado a ratones

Se prepararon los cuatro tipos de anticuerpos del receptor de IL-6 humanizado que se describen a continuación.

5 Como los anticuerpos que no se unen de manera dependiente del pH al receptor de IL-6, se expresaron y purificaron WT-IgG1 que incluye H (WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 9) y L (WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO:10) y H54/L28-IgG1 que incluye H54 (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 70) y L28 (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 12) mediante el método que se indicó en el Ejemplo 1. Como los anticuerpos que se unen de manera dependiente del pH al receptor de IL-6, se expresaron y purificaron H170/L82-IgG1 del Ejemplo 3 que incluye HI 70 (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 4) y L82 (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 7) y Fv4-IgG1 del Ejemplo 10 que incluye VH3-IgG1 (SEQ ID NO: 23) y VL3-CK (SEQ ID NO: 27) mediante el método que se indicó en el Ejemplo 1.

Análisis de la unión de cada tipo de anticuerpo al receptor de IL-6 soluble

15 El análisis cinético de las reacciones entre antígeno y anticuerpo a pH 7,4 y pH 5,8 se realizó usando Biacore T100 (GE Healthcare) para los cuatro tipos de anticuerpos preparados: WT-IgG1, H54/L28-IgG1, H170/L82-IgG1 y Fv4-IgG1 (amortiguador: 10 mM de MES (pH 7,4 o pH 5,8), 150 mM de NaCl, Surfactant-P20 al 0,05 %). Los anticuerpos se unieron a un chip sensor en el que se inmovilizó la proteína recombinante A/G (Pierce) mediante acoplamiento de amina y se inyectó SR344 ajustado a una concentración apropiada en este como analito. Se observó la asociación a y disociación de SR344 de cada tipo de anticuerpo en tiempo real. Todas las mediciones se realizaron a 37 °C. Se calcularon las constantes de velocidad de asociación k_a (1/Ms) y las constantes de velocidad de disociación k_d (1/s) usando Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare) y las constantes de disociación KD (M) en función de estos valores (Tabla 17).

[Tabla 17] Comparación de las velocidades de asociación (k_a), velocidades de disociación (k_d) y constantes de disociación de cada tipo de anticuerpo contra el receptor de IL-6 soluble (SR344)

Muestra	pH7,4			pH5,8			Dependencia del pH	
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD(M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD(M)	$k_d(pH5,8)/k_d(pH7,4)$	KD(pH5,8)/KD(pH7,4)
WT-IgG1	4,9E+05	9,4E-04	1,9E-09	8,9E+05	2,7E-03	3,1E-09	2,9	1,6
H54/L28-IgG1	8,3E+05	1,4E-03	1,7E-09	2,4E+06	2,7E-03	1,1E-09	2,0	0,7
H170/L82-IgG1	6,7E+05	1,1E-03	1,6E-09	1,2E+05	1,3E-02	1,0E-07	11,4	61,9
Fv4-IgG1	9,8E+05	9,5E-04	9,7E-10	1,4E+06	3,7E-02	2,6E-08	38,8	27,3

25 Se calculó la relación de afinidad (KD) a pH 5,8 y pH 7,4 para cada anticuerpo. La relación de KD, que indica la unión dependiente del pH a SR344, fue de 1,6, 0,7, 61,9 y 27,3 para WT-IgG1, H54/L28-IgG1, H170/L82-IgG1 y Fv4-IgG1, respectivamente. Además, se calculó la relación de velocidad de disociación (k_a) a pH 5,8 y pH 7,4 para cada anticuerpo. La relación de k_d , que indica la velocidad de disociación dependiente del pH para SR344, fue de 2,9, 2,0, 11,4 y 38,8 para WT-IgG1, H54/L28-IgG1, H170/L82-IgG1 y Fv4-IgG1, respectivamente. Por lo tanto, se confirmó que H170/L82-IgG1 y Fv4-IgG1 demuestran unión dependiente del pH, mientras que los anticuerpos convencionales WT-IgG1 y H54/L28-IgG1 difícilmente muestran la capacidad. Además, dado que la afinidad (KD) de estos anticuerpos a pH 7,4 fue casi igual, se cree que su capacidad de unión a SR344 en el plasma es equivalente.

Prueba de farmacocinética *in vivo* con ratones

35 Se evaluó la farmacocinética de SR344 y el anticuerpo del receptor de IL-6 anti-humano después de la administración de SR344 (receptor de IL-6 humano, preparado en el Ejemplo 1) solamente o administración simultánea de SR344 y el anticuerpo del receptor de IL-6 anti-humano a ratones que no expresan el receptor de IL-6 humano (C57BL/6J; los anticuerpos de receptor de IL-6 anti-humano que no se unen al receptor de IL-6 de ratón). Se administró una solución de SR344 (5 µg/mL) o una mezcla de solución que contiene SR344 y el anticuerpo del receptor de IL-6 anti-humano (5 µg/mL y 0,1 mg/mL, respectivamente) en la vena caudal mediante administración de única dosis a 10 mL/kg. Dado que el anticuerpo del receptor de IL-6 anti-humano se encontraba presente en una cantidad excesiva adecuada con respecto a SR344, se consideró que casi todas las moléculas de SR344 se unieron con el anticuerpo. Se recogieron muestras de sangre a los 15 minutos, 2 horas, 8 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 7 días, 14 días, 21 días y 28 días después de la administración. Las muestras de sangre recogidas se centrifugaron de inmediato durante 15 minutos a 15.000 rpm y 4 °C para obtener el plasma. El plasma separado se almacenó en un congelador configurado a -20 °C o menos hasta que se realizaron las mediciones. Se utilizaron WT-IgG1, H54/L28-IgG1, H170/L82-IgG1 y Fv4-IgG1 como los anticuerpos del receptor de IL-6 anti-humano.

Medición de concentración en plasma del anticuerpo del receptor de IL-6 anti-humano mediante ELISA

Se midió la concentración del anticuerpo del receptor de IL-6 humano en plasma de ratón mediante ELISA. Se

suministró IgG anti-humano (específico de cadena γ) fragmento F(ab')₂ de anticuerpo (Sigma) en un Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Naige Nunc International) y se dejó reposar durante la noche a 4 °C para preparar las placas inmovilizadas con IgG anti-humana. Se prepararon muestras de curva de calibración con concentraciones en plasma de 0,8, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 y 0,0125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y muestras de plasma de ratón diluidas 100 veces o más. Se agregaron 200 μL de 20 ng/mL de SR344 a 100 μL de las muestras de curva de calibración y muestras de plasma y luego se dejó que las muestras reposaran durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se colocaron en las placas inmovilizadas con IgG anti-humana y se dejaron en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se agregó anticuerpo IL-6R anti-humano biotinilado (R&D) para que reaccione durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó estreptavidina-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) para que reaccione durante 1 hora a temperatura ambiente y se realizó la reacción cromogénica con TMP One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) como sustrato.

Después de detener la reacción con ácido sulfúrico 1 N (Showa Chemical), se midió la absorbancia a 450 nm mediante un lector de microplacas. Se calculó la concentración en plasma de ratón a partir de la absorbancia de la curva de calibración con el software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). El periodo de tiempo de la concentración en plasma después de la administración intravenosa según se midió con este método se muestra en la Fig. 28.

Medición de concentración en plasma de SR344 mediante electroquimioluminiscencia

Se midió la concentración de SR344 en plasma de ratón mediante electroquimioluminiscencia de muestras de curva de calibración de SR344 ajustadas a concentraciones de 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 y 31,25 pg/mL , y se prepararon muestras de plasma de ratón diluidas 50 veces o más. Las muestras se mezclaron con una solución de anticuerpo IL-6R anti-humano monoclonal (R&D) etiquetado con rutenio con sulfo-Tag NHS éster (Meso Scale Discovery), anticuerpo IL-6R anti-humano biotinilado (R&D) y WT-IgG1, y luego se dejó que reaccionaran durante la noche a 37 °C. La concentración final de WT-IgG1 fue 333 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que supera la concentración del anticuerpo del receptor de IL-6 anti-humano contenido en las muestras, a los efectos de unir casi todas las moléculas de SR344 en las muestras a WT-IgG1. Posteriormente, se colocaron las muestras en una placa de estreptavidina MA400 PR (Meso Scale Discovery), y se dejaron reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente y se realizó el lavado. Inmediatamente después, se colocó Read Buffer T (x4) (Meso Scale Discovery), se realizó la medición con Sector PR 400 Reader (Meso Scale Discovery). Se calculó la concentración de SR344 en función de la respuesta de la curva de calibración usando el software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). El periodo de tiempo de la concentración en plasma de SR344 después de la administración intravenosa según se midió con este método se muestra en la Fig. 29.

Efectos de la unión dependiente del pH

Con respecto al periodo de tiempo de la concentración de anticuerpo de WT-IgG1 y H54/L28-IgG1 que no demuestran la unión dependiente del pH, y H170/L82-IgG1 y Fv4-IgG1, que demuestran la unión dependiente del pH, el periodo de tiempo de concentración fue aproximadamente idéntico para WT-IgG1, H54/L28-IgG1 y Fv4-IgG1, mientras que H170/L82-IgG1 se eliminó ligeramente más rápido. Los datos del periodo de tiempo de concentración en plasma se analizaron mediante el software de análisis de farmacocinética WinNonlin (Pharsight). Las semividas en plasma de WT-IgG1, H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1 y H170/L28-IgG1 fueron 21,0, 28,8, 26,2 y 7,5 días, respectivamente.

Como se describe en el Ejemplo 2, cuando el antígeno es un antígeno soluble, un anticuerpo administrado se une al antígeno en el plasma, y permanece en el plasma en forma de un complejo antígeno-anticuerpo. En general, a diferencia del tiempo de retención en plasma extremadamente largo de un anticuerpo (la velocidad de eliminación es extremadamente baja) debido a la función de FcRn, el tiempo de retención en plasma de un antígeno es breve (la velocidad de eliminación es alta). Por lo tanto, un antígeno que se une a un anticuerpo tiene un tiempo de retención en plasma prolongado similar al de un anticuerpo (la velocidad de eliminación es extremadamente baja). De manera similar, cuando se administró solo el anticuerpo del receptor de IL-6 humanizado, SR344 (receptor de IL-6 humano soluble), SR344 se eliminó extremadamente rápido (semivida en plasma: 0,2 días). Sin embargo, en el caso de la administración simultánea de SR344 y un anticuerpo convencional, WT-IgG1 o H54/L28-IgG1, que no demuestra la unión dependiente del pH, la velocidad de eliminación de SR344 se redujo considerablemente, y se prolongó el tiempo de retención de plasma de SR344 (semivida en plasma: 5,3 días para WT-IgG1, 6,3 días para H54/L28-IgG1). Esto se debe a que casi todas las moléculas de SR344 se unieron con los anticuerpos administrados conjuntamente y, por lo tanto, SR344 unido con los anticuerpos presentó un tiempo de retención en plasma prolongado similar al del anticuerpo, debido a la función de FcRn, como se describió anteriormente.

En el caso de la administración simultánea del anticuerpo SR344 y HI 70/L82-IgG1 o Fv4-IgG1, que demuestra la unión dependiente del pH, la eliminación de SR344 fue significativamente rápida (semivida en plasma: 1,3 días para H170/L82-IgG1, 0,6 días para Fv4-IgG1), en comparación con el caso de la administración simultánea con WT-IgG1 o H54/L28-IgG1. Esta tendencia fue particularmente prominente para Fv4-IgG1. Dado que la afinidad de Fv4-IgG1 a pH 7,4 es equivalente a o más fuerte que la afinidad de WT-IgG1 y H54/L28-IgG1, se cree que casi todas las moléculas de SR344 se unieron con Fv4-IgG1. Aunque Fv4-IgG1 demuestra retención en plasma equivalente o ligeramente más prolongada y eliminación más lenta en comparación con WT-IgG1 y H54/L28-IgG1, la eliminación

de SR344 unido a Fv4-IgG1 fue extremadamente rápida. Esto se puede explicar mediante el concepto de la tecnología presente que se muestra en la Fig. 4. En el caso de anticuerpos convencionales que no demuestran la unión dependiente del pH, se absorbe un complejo de antígeno soluble y anticuerpo en endosomas mediante pinocitosis en el plasma y se une a FcRn expresado en endosomas en condiciones ácidas intraendosómicas. Dado que el complejo de antígeno soluble y anticuerpo unido a FcRn se transfiere a la superficie celular tal como está, y regresa nuevamente al plasma, el antígeno unido con el anticuerpo tiene un tiempo de retención en plasma prolongado similar al del anticuerpo (la eliminación es extremadamente lenta). Por otro lado, en el caso de anticuerpos que demuestran la unión dependiente del pH, el antígeno se disocia del anticuerpo en condiciones ácidas intraendosómicas y, por lo tanto, solamente el anticuerpo se une a FcRn y regresa nuevamente al plasma. Dado que el antígeno disociado del anticuerpo se degrada en los lisosomas sin regresar al plasma, la eliminación del antígeno es extremadamente rápida en comparación con el caso de los anticuerpos que no demuestran la unión dependiente del pH. A saber, en el caso de la administración simultánea de SR344 y el anticuerpo WT-IgG1 o H54/L28-IgG1, que no demuestra la unión dependiente del pH, la eliminación de SR344 es lenta en un grado similar al anticuerpo, dado que SR344 se une a WT-IgG1 o H54/L28-IgG1 tanto en el plasma como en los endosomas. Por el contrario, en el caso de la administración simultánea de SR344 y el H170/L82-IgG1 o Fv4-IgG1, que demuestra la unión dependiente del pH, la eliminación de SR344 es extremadamente rápida, dado que SR344 se disocia del anticuerpo en el entorno de pH bajo intraendosómico. Es decir, dado que los anticuerpos H170/L28-IgG1 y Fv4-IgG1, que demuestran la unión dependiente del pH, se disocian de SR344 en el entorno de pH bajo intraendosómico, se cree que la mayor parte de H170/L82-IgG1 o Fv4-IgG1 que ha regresado nuevamente al plasma con FcRn no se une a SR344. Por lo tanto, como se muestra en la Fig. 4, se reveló que, al disociarse de un antígeno en el entorno de pH bajo intraendosómico y regresar al plasma con FcRn sin unirse al antígeno, un anticuerpo que demuestra la unión dependiente del pH puede unirse nuevamente a un antígeno en el plasma. Se demostró que, al repetir este proceso, el anticuerpo que demuestra la unión dependiente del pH se puede unir de forma reiterada a varios antígenos. Esto concuerda con los datos de Biacore que se muestran en el Ejemplo 7, lo que demuestra que los anticuerpos dependientes del pH se pueden unir de forma reiterada a los antígenos. Por lo tanto, al potenciar la unión dependiente del pH de un anticuerpo a un antígeno, se puede aumentar la cantidad de veces de unión al antígeno reiterada.

Cuando el antígeno es un antígeno soluble, y el antígeno se une a un anticuerpo en condiciones neutras de plasma, pero se disocia del anticuerpo en los endosomas y el anticuerpo regresa al plasma con FcRn, el anticuerpo puede unirse nuevamente a un antígeno en condiciones neutras de plasma. Por lo tanto, un anticuerpo que tiene la capacidad de disociarse de un antígeno en condiciones ácidas intraendosómicas puede unirse a los antígenos varias veces. En comparación con el momento en el que un antígeno unido con un anticuerpo no se disocia del anticuerpo en los endosomas (*es decir.*, el antígeno unido con el anticuerpo regresa al plasma), si un antígeno unido a un anticuerpo se disocia del anticuerpo en los endosomas, aumenta la velocidad de eliminación del plasma del antígeno, dado que el antígeno se transporta a los lisosomas y se degrada. Por lo tanto, la velocidad de eliminación del plasma de un antígeno se puede utilizar como índice para determinar si un anticuerpo se puede unir al antígeno varias veces. La determinación de la velocidad de eliminación del plasma de un antígeno se puede realizar, por ejemplo, mediante la administración de un antígeno y un anticuerpo *in vivo*, y luego mediante la medición de la concentración del antígeno en plasma después de la administración, como se muestra en los Ejemplos.

Un anticuerpo que demuestra la unión dependiente del pH se puede unir de forma reiterada a varios antígenos en oposición al caso de un anticuerpo convencional que no demuestra unión dependiente del pH. Por lo tanto, se puede reducir considerablemente la cantidad de anticuerpo administrado, y se pueden prolongar en gran medida los intervalos de administración.

La unión reiterada a varios antígenos de este mecanismo se basa en la reacción entre el antígeno y el anticuerpo dependiente del pH. Por lo tanto, independientemente del tipo de antígeno, si se puede construir un anticuerpo que demuestra la unión dependiente del pH que se une a un antígeno a pH 7,4 de plasma pero se disocia del antígeno a pH ácido intraendosómico, dicho anticuerpo se puede unir de forma reiterada a varios antígenos. Por consiguiente, la tecnología de la presente es útil dado que se puede aplicar no solamente a anticuerpos del receptor de IL-6, IL-6, y al receptor de IL-31, sino de manera general a cualquier anticuerpo a cualquier antígeno, independientemente del tipo de antígeno.

Listado de secuencias

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

5 <120> MOLÉCULAS DE UNIÓN A ANTÍGENO QUE SE UNEN REPETIDAMENTE A MÚLTIPLES MOLÉCULAS DE ANTÍGENO

<130> C1-A0801Y2P

10 <150> JP 2008-104147
<151> 2008-04-11

<150> JP 2008-247713
<151> 2008-09-26

15 <150> JP 2009-068744
<151> 2009-03-19

<160> 70

20 <170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 119

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

30 <400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Asp Asp
20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

35 <210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

40

ES 2 563 483 T3

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 2

5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu
100 105

<210> 3

<211> 119

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

15

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

His Ala His Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
35 40 45

ES 2 563 483 T3

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10

<400> 4

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His His
20 25 30

His Ala His Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr His Tyr Asn Pro His Leu
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Leu Ala Arg Ile Thr Ala Met Asp His Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

15

<210> 5
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

20

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

ES 2 563 483 T3

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His Trp Gly Glu Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

- 5 <210> 6
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 6

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln His Ile Ser Ser His
 15 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Gly Ser His Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu
 100 105

- 20 <210> 7
- <211> 107

ES 2 563 483 T3

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser His
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Gly Ser His Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu
100 105

10

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 8

20

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser His
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Gly Ser His Leu His His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly His Arg Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu
100 105

ES 2 563 483 T3

<210> 9
<211> 448
<212> PRT
5 <213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10 <400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

ES 2 563 483 T3

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

ES 2 563 483 T3

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 10
<211> 214
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

ES 2 563 483 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 11

<211> 119

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10

<400> 11

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Asp Asp
20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp

ES 2 563 483 T3

35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Leu Ala Arg Ile Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12
<211> 107
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 12

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu
100 105

15 <210> 13
<211> 1404
<212> DNA
<213> Artificial

20 <220>
<223> Una secuencia nucleotídica sintetizada artificialmente

<400> 13

ES 2 563 483 T3

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactcccag 60
 gtccaactgc aggagagcgg tccaggtcct gtgaaaccta gcgagaccct gagcctgacc 120
 tgcgccgtgt ctggctactc aattagcgac gatcatgcct ggagctgggt tcgccagcca 180
 cctggagaag gtcttgagtg gattggatac attagttata gtggaatcac aaactataat 240
 ccatctctca aaggcagagt gacaatatcg agagacacca gcaagaacca gttcagcctg 300
 aaactcagca gcgtgacagc cgccgacacc gggccttatt attgtgcaag atccctagct 360
 cggactacgg ctatggacta ctggggtgaa ggcaccctcg tcacagtctc ctcagcctcc 420
 accaagggcc catcgttctt cccoctggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca 480
 gggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540
 tcaggcgcgc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 600
 tactccctca gcagcgtggt gaccgtgcc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 660
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtgaca agaaagttga gcccaaactc 720
 tgtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 780
 gtcttctct tccccocaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac cctgaggtc 840
 acatgcgtgg tggtagcgtg gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 900
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 960
 tacctgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1020
 aagtcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaagcc 1080
 aaaggcagc cccgagaacc acagggtgac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1140
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1200
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260
 tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctaccctggg acaagagcag gtggcagcag 1320
 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1380
 agcctctccc tgtctccggg taaa 1404

<210> 14
 <211> 321
 5 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia nucleotídica sintetizada artificialmente

10 <400> 14

gacatccaga tgaccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagcgtgacc 60
 atcacctgtc aagccagcca ggaatcagc agttacctga attggtacca gcagaagcca 120
 ggaaaggctc cagagctgct gatctactac ggctccgaac tgcactctgg tgtgccaagc 180
 agattcagcg gtgagcgtag cgttaccgac ttcaccttca ccatcagcag cctcgaggca 240
 gaggacgccg ctacctacta ctgcgggcag ggtaaccggc ttccatacac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcga a 321

15 <210> 15

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 10 1 5 10 15

<210> 16
 <211> 24
 <212> DNA
 15 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente

20 <400> 16

ttcccaccag cctgtccgcc tctg 24

<210> 17
 25 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 30 <223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente

<400> 17

cgtgaagcca aaggcccccac tccc 24

35 <210> 18
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente

<400> 18

45 tagaattcca ccatgctggc cgtcggctgc gc 32

<210> 19
 <211> 57
 50 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente

55 <400> 19

attgcggccg cttatcagtg gtgatgatga tgatgtggta ccgaagaaga atcttgc 57

60 <210> 20
 <211> 1131
 <212> DNA
 <213> Artificial

65 <220>

ES 2 563 483 T3

<223> Una secuencia nucleotídica sintetizada artificialmente

<400> 20

	gaattccacc atgctggccg tcggctgcgc gctgctggct gccctgctgg ccgcgccggg	60
	ggcggcgctg gccccggggg gctgccctgc acaggagggt gcgagagggt tgctgaccag	120
	tctgccagga gacagcgtga ctctgacctg cccaggggga gagccggaag acaatgccac	180
	tgttcaactgg gttctcagga agccagctgt aggctccac ctcaagcagat gggctggcgt	240
	gggaaggagg ctgctgctga ggtcgggtga gctccatgac tctggaaact attcatgcta	300
	ccgggccggc cggccggctg gaactgtgca cttgctgggt gatgttccc ccgaggagcc	360
	ccagctctcc tgcttcggga agagccccct cagcaacgtt gtttgtgagt ggggtcctcg	420
	gagcacccca tctccgacga ccaaggctgt gctgttggtg aggaagtttc agaacagtcc	480
	ggccgaagac ttccaggagc cgtgccagta ttccaggag tccagaagt tctcctgcca	540
	gttggcagtc ccggaggag acagctcttt ctacatagtg tccatgtgctg tcgccagtag	600
	tgtcgggagc aagctcagca aaactcagac ctttcagggt tgtggaatct tgcagcctga	660
	tccgctgcc aacatcacag tcaactgccg ggccagaaac ccccgctggc tcagtgtcac	720
	ctggcaagac cccactcct ggaactcatc tttctacaga ctacggtttg agctcagata	780
	tcgagctgaa cgtcaaaga cattcacaac atggatggtc aaggacctcc agcatcactg	840
5	tgatcatccac gacgcctgga gcggcctgag gcacgtgggt cagcttcgtg cccaggagga	900
	gttcgggcaa ggcgagtgga gcgagtggag cccggaggcc atgggcacgc cttggacaga	960
	atccaggagt cctccagctg agaacgaggt gtccaccccc acgcaggcac ctactactaa	1020
	taaagatgat gataatattc tctccagaga ttctgcaaat gcgacaagcc tccagtgca	1080
	agattcttct tcggtaccac atcatcatca tcaccaactga taagcggccg c	1131

<210> 21

10 <211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 21

ES 2 563 483 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His Trp Gly Glu Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

ES 2 563 483 T3

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

ES 2 563 483 T3

<211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 22

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu
 50 55 60
 Gln Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His Trp Gly Glu Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

10

ES 2 563 483 T3

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys

ES 2 563 483 T3

405

410

415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 23

<211> 449

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10

<400> 23

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

ES 2 563 483 T3

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu

ES 2 563 483 T3

385	390	395	400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys	405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu	420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly	435	440	445
Lys			
<210> 24			
<211> 449			
5 <212> PRT			
<213> Artificial			
<220>			
10 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente			
<400> 24			
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp	20	25	30
His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp	35	40	45
Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu	50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly	100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe	115	120	125

ES 2 563 483 T3

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

ES 2 563 483 T3

370

375

380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 25

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Arg Asp Ile Ser Ser His
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

ES 2 563 483 T3

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 26

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10

<400> 26

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Arg Asp Ile Ser Ser His
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Gly Ser His Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
 85 90 95

ES 2 563 483 T3

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 27
 <211> 214
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10 <400> 27

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

ES 2 563 483 T3

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 28

<211> 326

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

10

ES 2 563 483 T3

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

5 <210> 29
<211> 324
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 563 483 T3

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

5 <400> 29

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

ES 2 563 483 T3

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro

<210> 30
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10

<400> 30

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

ES 2 563 483 T3

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro

5 <210> 31
<211> 326
<212> PRT

ES 2 563 483 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

5

<400> 31

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

ES 2 563 483 T3

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 32

<211> 324

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10

<400> 32

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

ES 2 563 483 T3

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro

ES 2 563 483 T3

<210> 33
 <211> 443
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10 <400> 33

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

ES 2 563 483 T3

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440

ES 2 563 483 T3

<210> 34
 <211> 443
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10 <400> 34

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

ES 2 563 483 T3

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

ES 2 563 483 T3

<210> 35
 <211> 443
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10 <400> 35

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

ES 2 563 483 T3

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

ES 2 563 483 T3

<210> 36
 <211> 445
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10 <400> 36

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu
 50 55 60
 Gln Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His Trp Gly Glu Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

ES 2 563 483 T3

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

ES 2 563 483 T3

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 37.

<211> 443

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 37

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

ES 2 563 483 T3

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

ES 2 563 483 T3

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 38

<211> 445

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 38

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140

ES 2 563 483 T3

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

ES 2 563 483 T3

<210> 39
 <211> 443
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10 <400> 39

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

ES 2 563 483 T3

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

ES 2 563 483 T3

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

5 <210> 40
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
<400> 40

His Asp His Ala Trp Ser
1 5

15 <210> 41
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
<400> 41

25 His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu Gln Asp
1 5 10 15

30 <210> 42
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
<400> 42

Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Gln Gly
1 5 10 15

40 <210> 43
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
<400> 43

Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu Gln Gly
1 5 10 15

50 <210> 44

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 44

10 Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His
 1 5 10

<210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

20 <400> 45

Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210> 46
 <211> 30
 <212> PRT
 25 <213> Artificial

<220>
 30 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 46

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
 20 25 30

35 <210> 47
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 47

45 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser
 20 25 30

<210> 48
 <211> 14
 50 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

55

ES 2 563 483 T3

<400> 48

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

5 <210> 49
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 49

Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

15 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 50
<211> 32
<212> PRT
20 <213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

25 <400> 50

Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

30 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 51
<211> 32
<212> PRT
35 <213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 51

40 Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 52
<211> 11
45 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

50 <400> 52

Trp Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 53
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 10 <400> 53

 Gln Ala Ser Arg Asp Ile Ser Ser His Leu Asn
 1 5 10

 <210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 <400> 54

 Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His Leu Asn
 25 1 5 10

 <210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 <400> 55

 Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser
 1 5

 40 <210> 56
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 <400> 56

 Tyr Gly Ser His Leu Glu Ser
 50 1 5

 <210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 55 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 60 <400> 57

 Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 58
 <211> 23
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 10 <400> 58

 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

 Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys
 20

 <210> 59
 15 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 <400> 59

 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

 25 <210> 60
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 <400> 60

 35 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

 Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

 <210> 61
 <211> 10
 40 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 45 <400> 61

 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu
 1 5 10

 50 <210> 62
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial

 55 <220>

ES 2 563 483 T3

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 62

5
 1 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Lys Leu Leu Lys Pro Gly Gly
 5 10 15
 20 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 25 30
 35 Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 40 45
 50 Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 55 60
 65 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 70 75 80
 85 Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 90 95
 100 Ala Arg Gly Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 105 110
 115 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 120 125
 130 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 135 140
 145 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 150 155 160
 165 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 170 175
 180 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 185 190
 195 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 200 205
 210 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 215 220
 225 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 230 235 240
 245 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 250 255

ES 2 563 483 T3

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 63

<211> 213

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10

<400> 63

ES 2 563 483 T3

Gln Ile Val Leu Ile Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 64
 <211> 449
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10 <400> 64

ES 2 563 483 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Lys Leu Leu Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr His Pro His Thr Val
 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Leu Trp Gly His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

ES 2 563 483 T3

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

5 <210> 65
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 65

ES 2 563 483 T3

Gln Ile Val Leu Ile Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45

Asp Thr Ser Asn His Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Trp Ser Gly His Pro Tyr Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

5 <210> 66
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 66

ES 2 563 483 T3

Gln Ile Val Leu Ile Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser His His Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Trp Ser Gly His Pro Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

5 <210> 67
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 67

ES 2 563 483 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Asp Val Val Pro Ala Ala Met Ser Phe Tyr Tyr Gly Met
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His

ES 2 563 483 T3

165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
450 455

ES 2 563 483 T3

<210> 68
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 68

10

Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Thr Val
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
 35 40 45
 Asp Asp Thr Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ala
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Asp His
 85 90 95
 Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
 100 105 110
 Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
 115 120 125
 Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
 130 135 140
 Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
 165 170 175
 Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
 180 185 190
 Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
 195 200 205
 Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 210

15

<210> 69
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 563 483 T3

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

5 <400> 69

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

His Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Asp Val Val Pro Ala Ala Met Ser Phe Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

ES 2 563 483 T3

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

ES 2 563 483 T3

370

375

380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
450 455

<210> 70
<211> 449
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 70

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Asp Asp
20 25 30

Gln Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

ES 2 563 483 T3

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

ES 2 563 483 T3

	355						360										365
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu		
	370					375					380						
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu		
385					390					395					400		
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys		
				405					410					415			
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu		
			420					425					430				
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
		435					440					445					

Lys

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para mejorar la farmacocinética de un anticuerpo, dicho método comprende sustituir al menos un aminoácido de una CDR del anticuerpo con una histidina, o insertar al menos una histidina en una CDR del anticuerpo, en donde la sustitución o inserción de histidina aumenta el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ en comparación con el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ antes de la sustitución o inserción de histidina, en donde dicho valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ se define como la relación de la actividad de unión al antígeno a pH 5,8 y la actividad de unión al antígeno a pH 7,4, y en donde dicha sustitución o inserción de histidina
- 10 (a) prolonga la semivida en plasma o el tiempo de retención en plasma promedio de dicho anticuerpo; o
- (b) aumenta la cantidad de veces de unión al antígeno de dicho anticuerpo, que corresponde a un aumento de la cantidad de ciclos en que dicho anticuerpo unido con un antígeno se internaliza en una célula y se libera en forma libre de antígeno al exterior de la célula.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en donde el valor de $KD(pH5,8)/KD(pH7,4)$ después de la sustitución o inserción de histidina es 2 o superior, 10 o superior o 40 o superior.

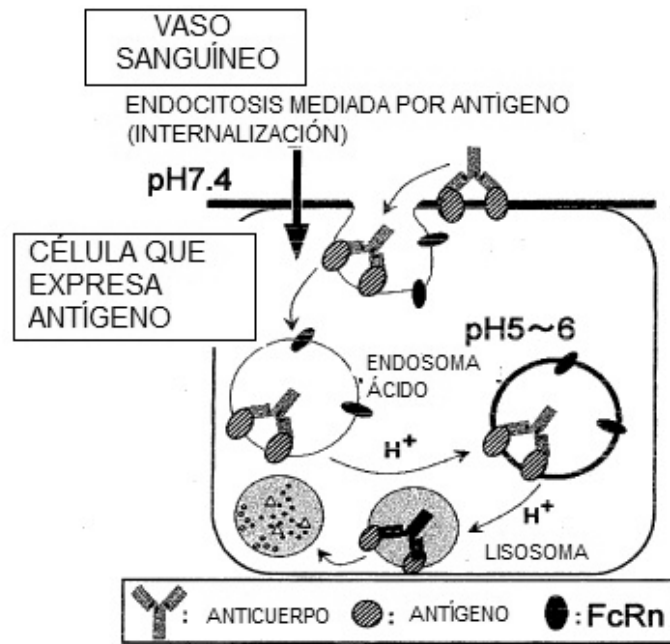


FIG. 1

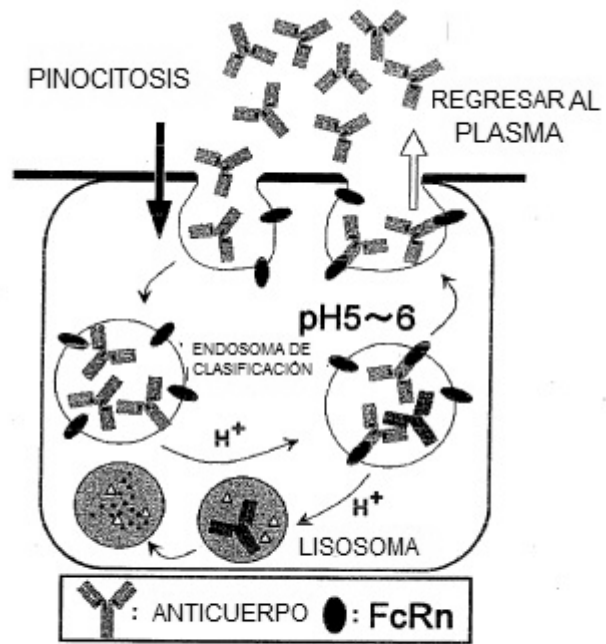


FIG. 2

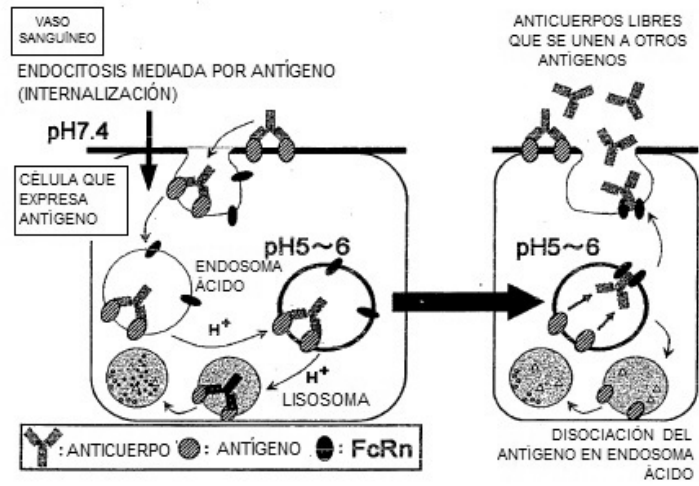


FIG. 3

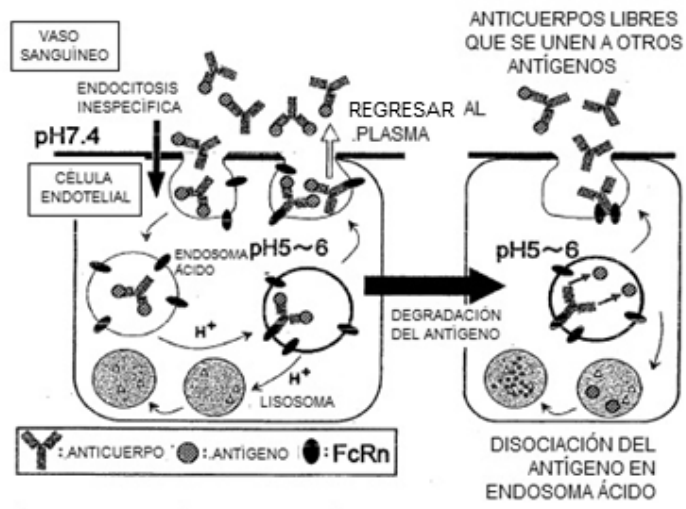


FIG. 4

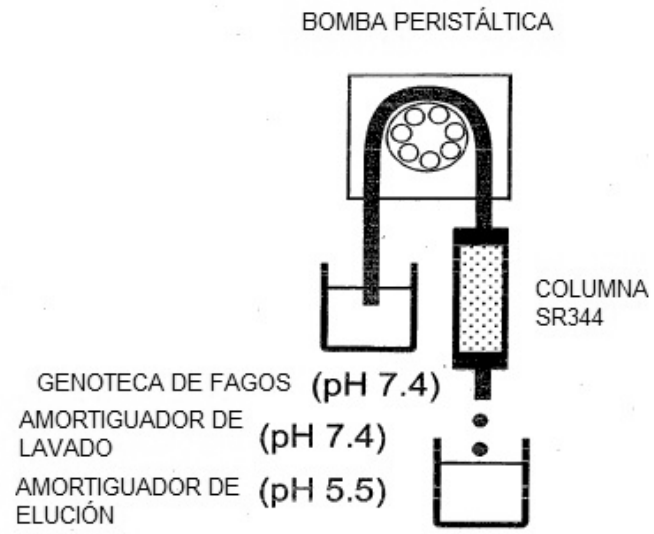


FIG. 5

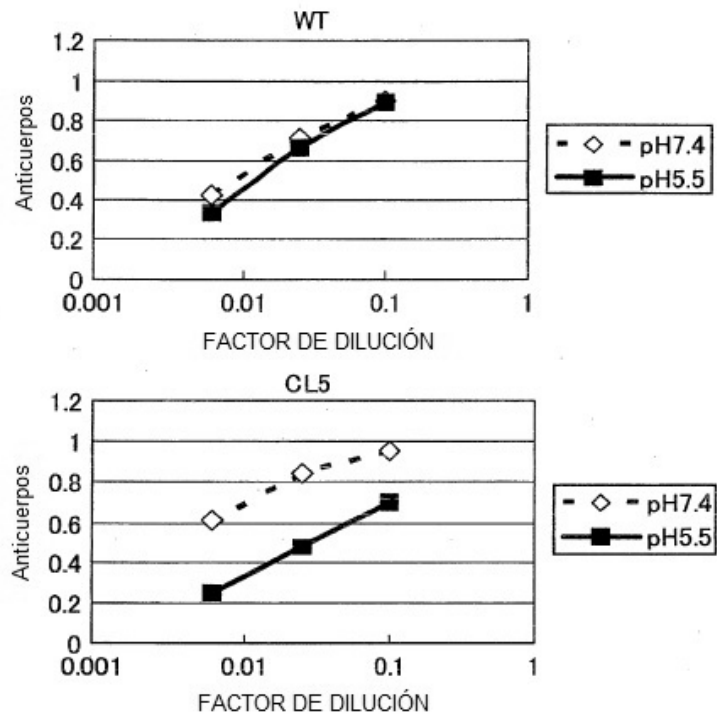


FIG. 6

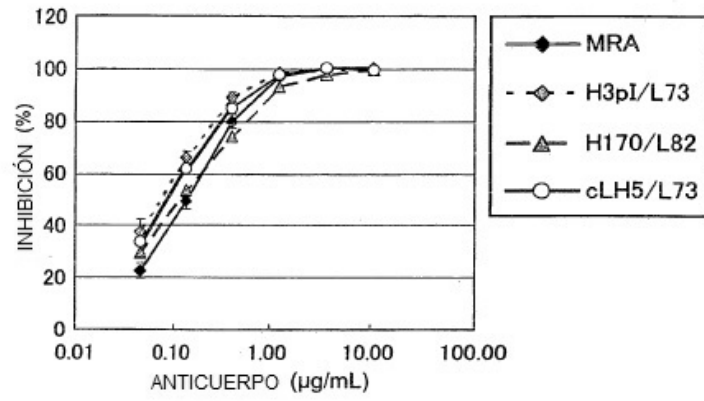


FIG. 7

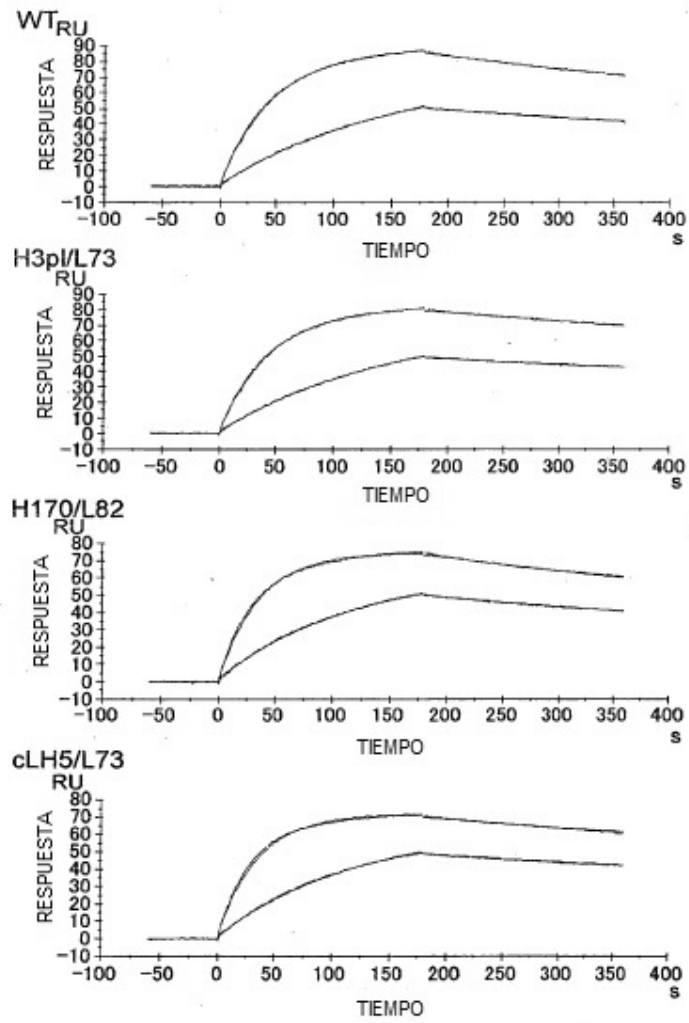


FIG. 8

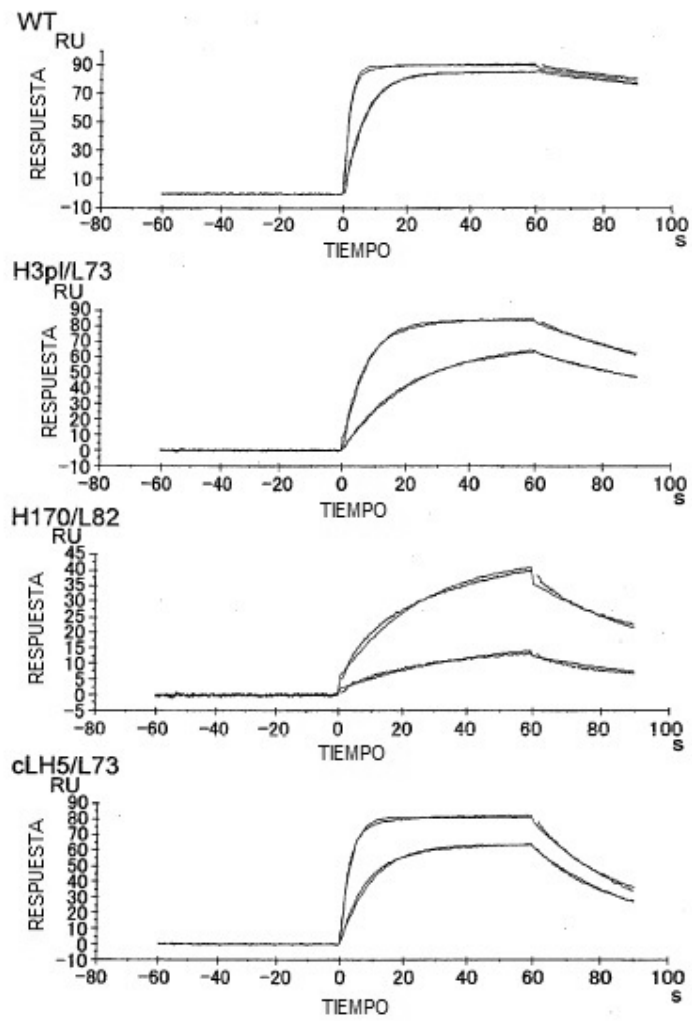


FIG. 9

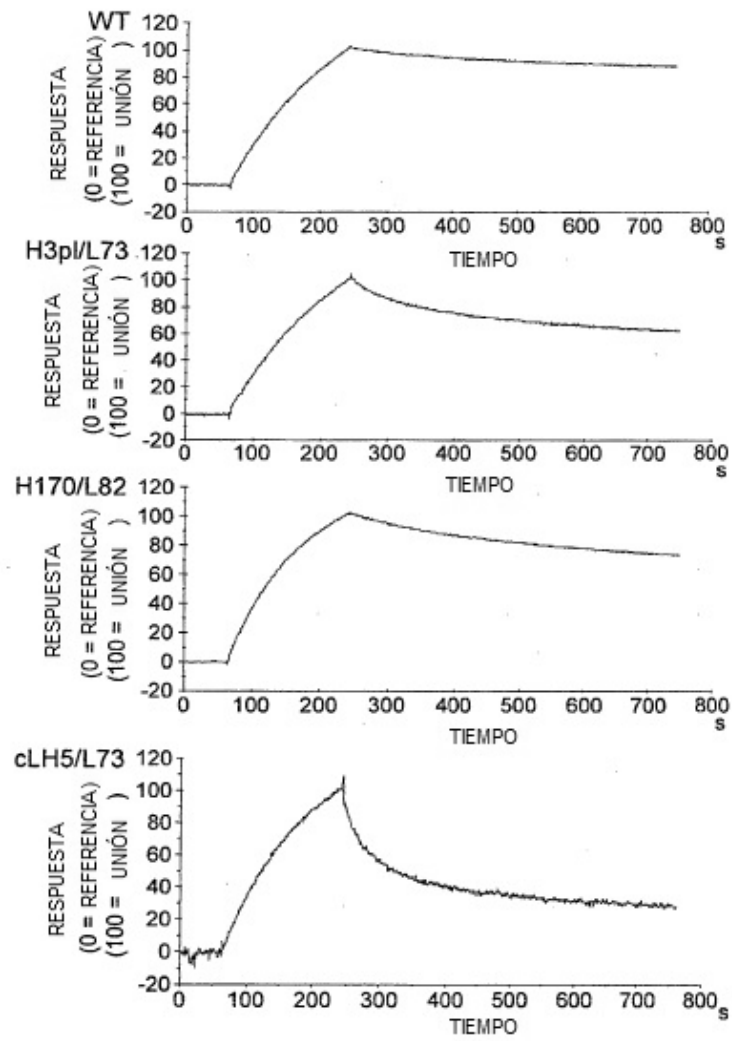


FIG. 10

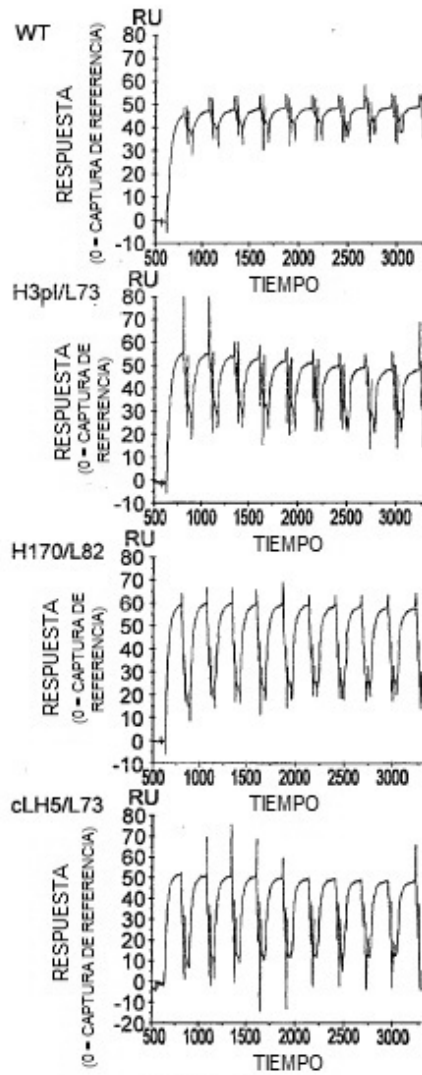


FIG. 11

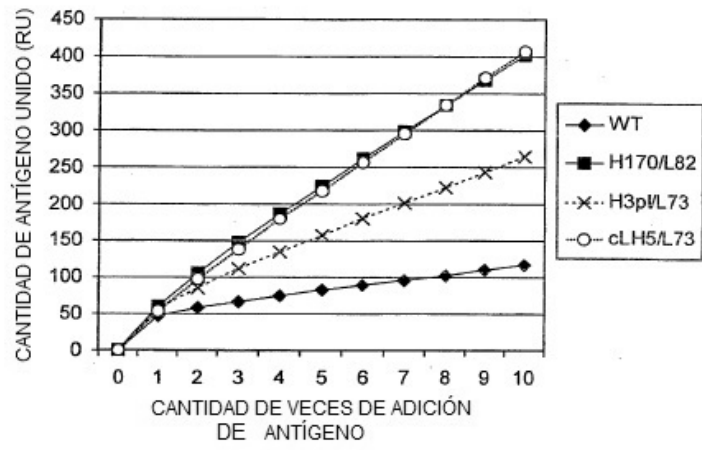


FIG. 12

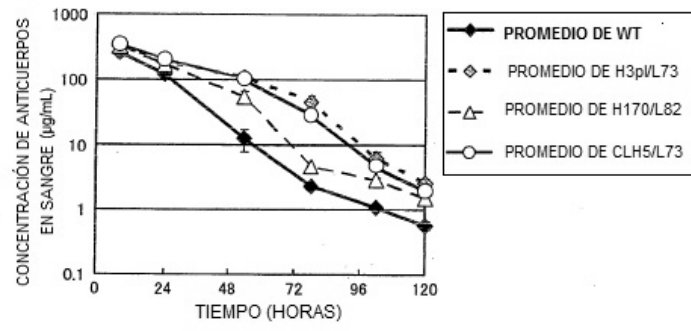


FIG. 13

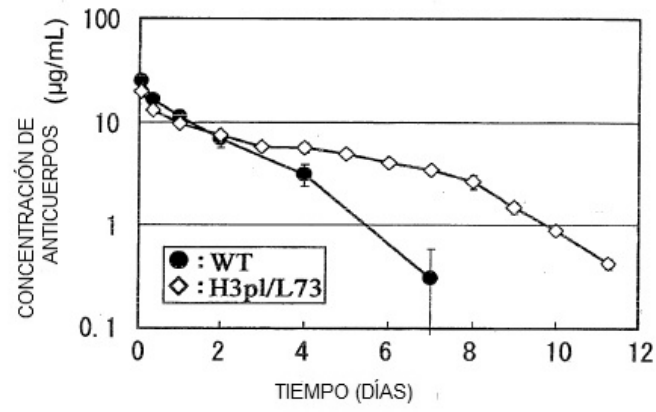


FIG. 14

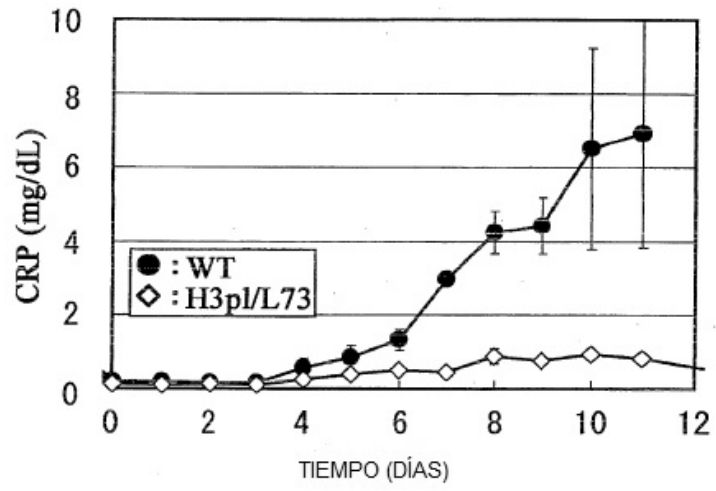


FIG. 15

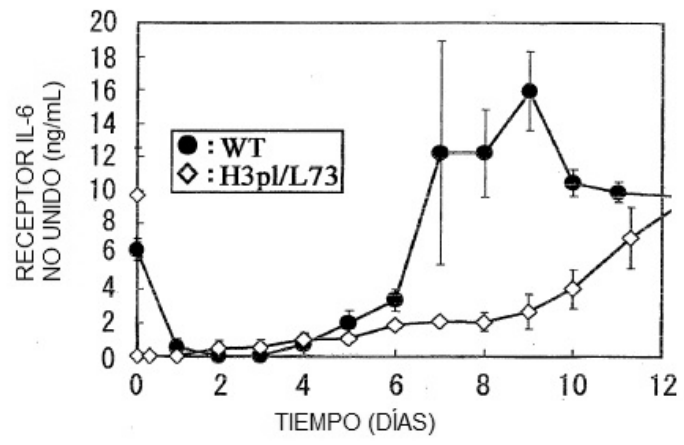


FIG. 16

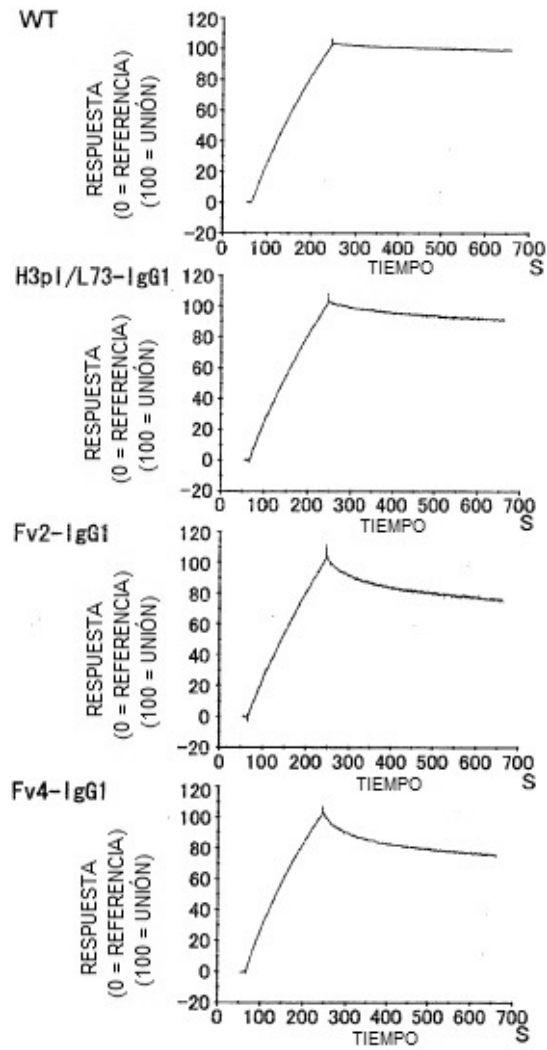


FIG. 17

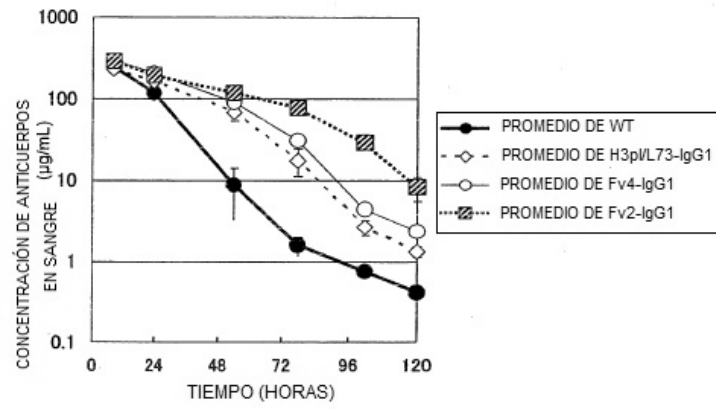


FIG. 18

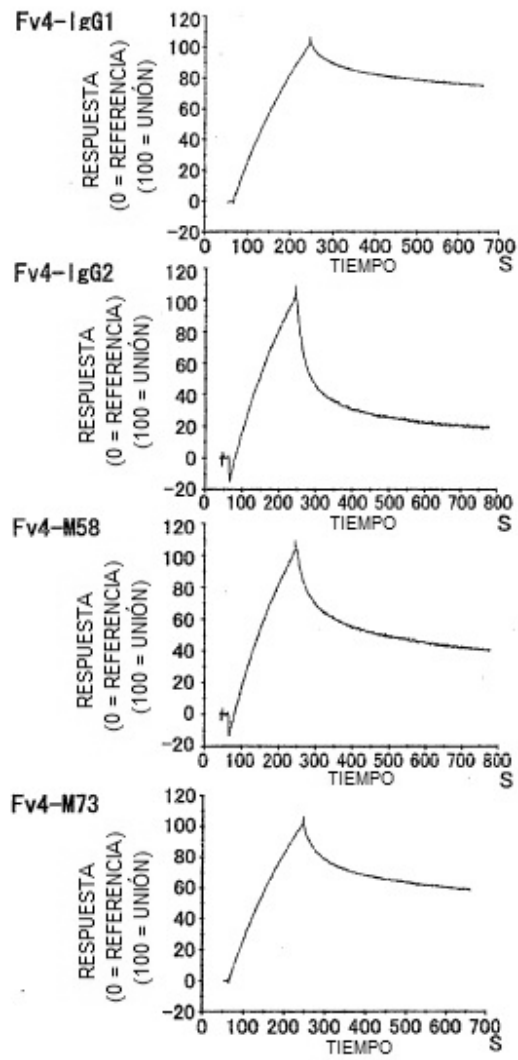


FIG. 19

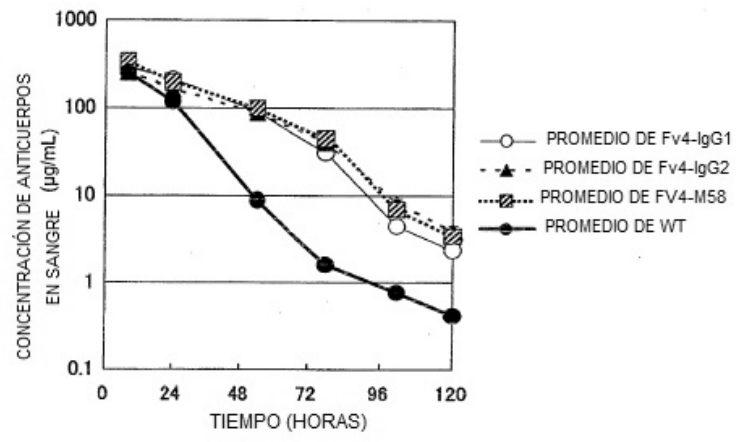


FIG. 20

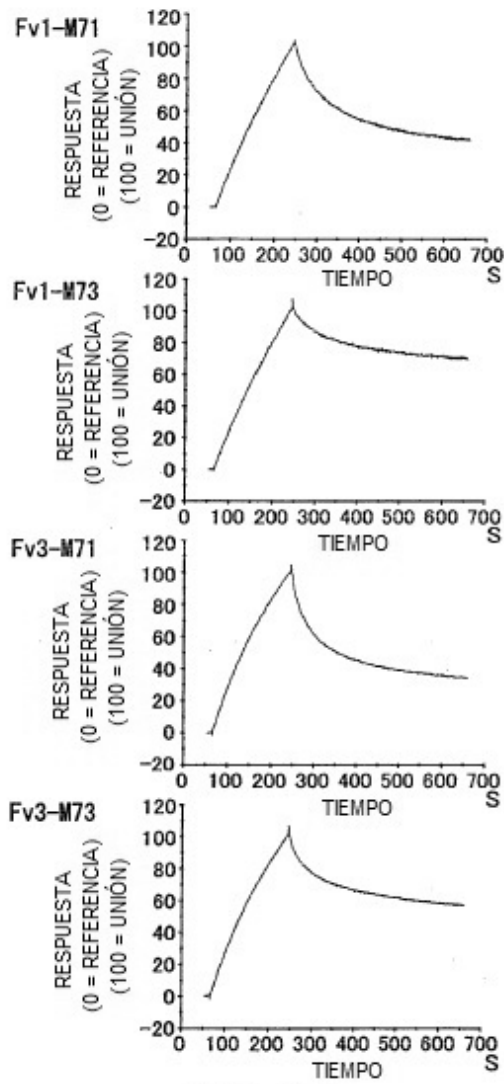


FIG. 21

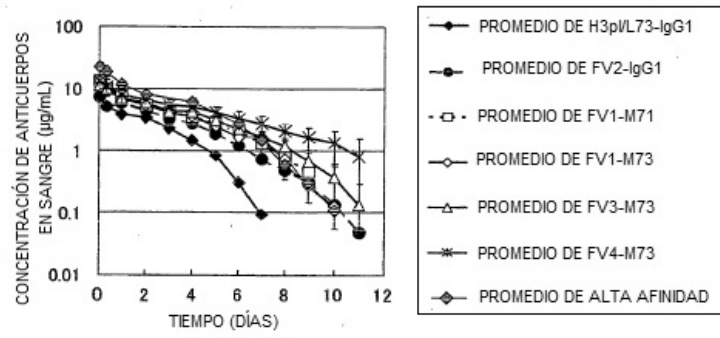


FIG. 22

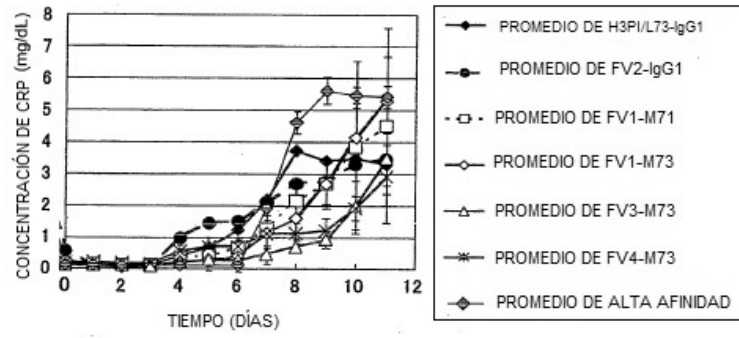


FIG. 23

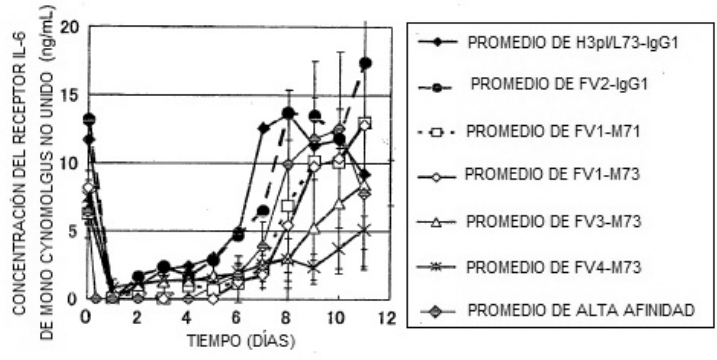


FIG. 24

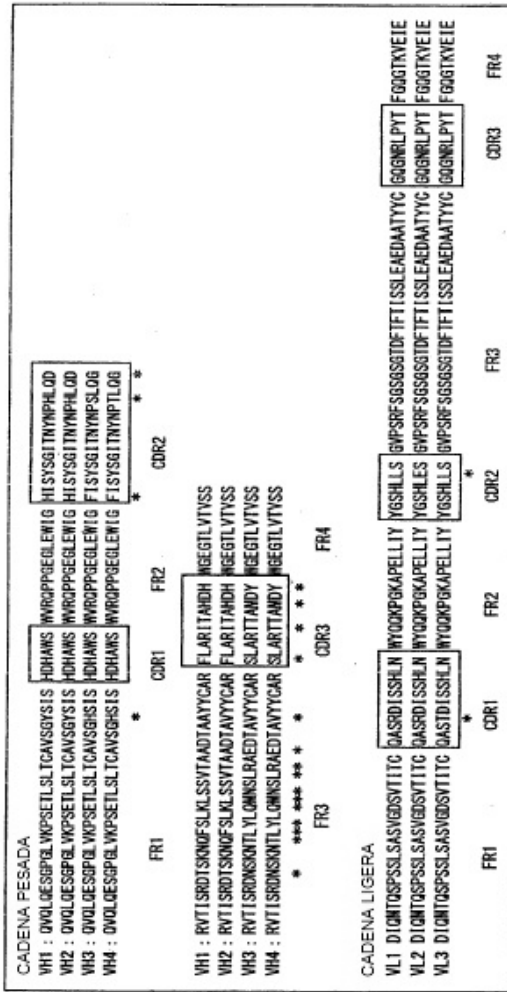


FIG. 25

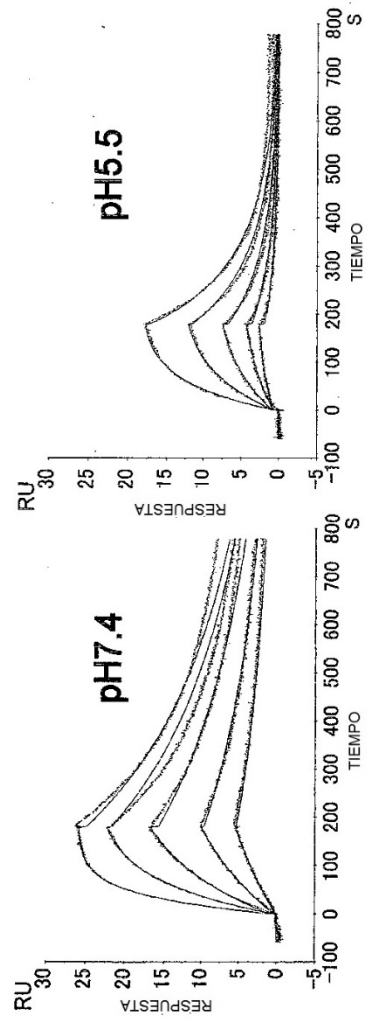


FIG. 26

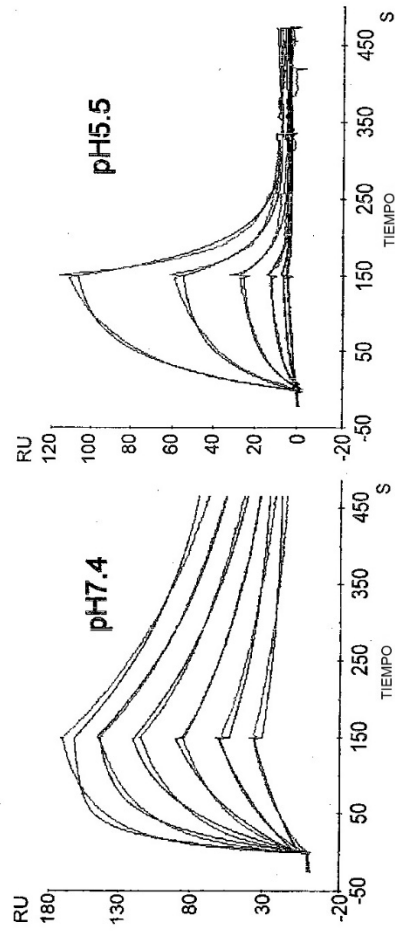


FIG. 27

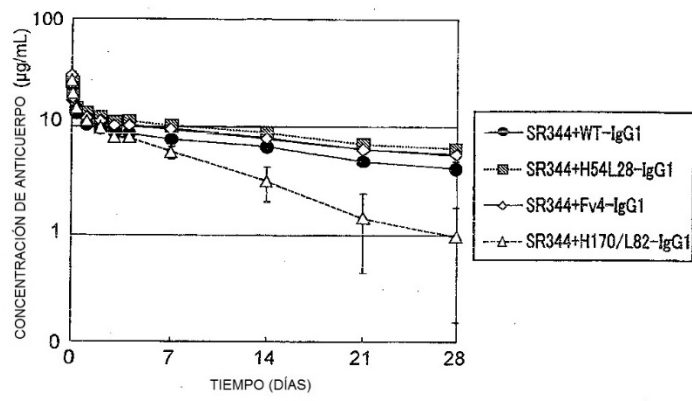


FIG. 28

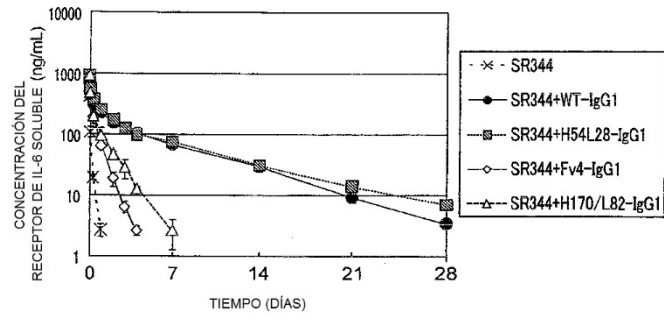


FIG. 29