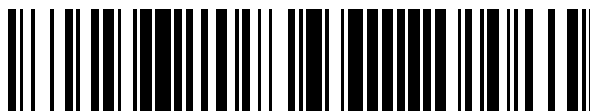


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 957**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2008 E 08834649 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2194066**

54 Título: **Región constante de anticuerpo modificado**

30 Prioridad:

26.09.2007 JP 2007250147

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

18.04.2016

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 y
SHIRAIWA, HIROTAKE**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 566 957 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

Región constante de anticuerpo modificado

Campo técnico

La invención se refiere a:

- 5 [1] Una región constante de anticuerpo humano de una cualquiera de:

(a) una región constante de anticuerpo humano que comprende eliminaciones tanto de Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración EU) como de Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y

- 10 (b) una región constante de anticuerpo humano que comprende eliminaciones tanto de Gly en la posición 326 (posición 446 en el sistema de numeración EU) como de Lys en la posición 327 (posición 447 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

Además, la descripción se refiere en general a regiones constantes de anticuerpo que tienen mejores propiedades fisicoquímicas (estabilidad y homogeneidad), inmunogenicidad (antigenicidad) y seguridad y/o semivida en el plasma; y anticuerpos que comprenden las regiones constantes.

15 **Antecedentes de la invención**

Los anticuerpos atraen la atención como productos farmacéuticos puesto que son muy estables en el plasma (sangre) y tienen pocos efectos adversos. De ellos, están disponibles en el mercado una serie de productos farmacéuticos de anticuerpos de tipo IgG, y actualmente están en desarrollo muchos productos farmacéuticos de anticuerpos (documentos de no patente 1 y 2).

- 20 Casi todos los productos farmacéuticos de anticuerpos disponibles en el mercado son de la subclase IgG1. Se espera que los anticuerpos de tipo IgG1 sean útiles como productos farmacéuticos de anticuerpos anticáncer puesto que se pueden unir al receptor Fcγ y ejercer actividad de ADCC. Sin embargo, la unión del dominio Fc al receptor Fcγ, que es importante para la función efectora tal como la ADCC, puede producir efectos adversos innecesarios, y por lo tanto, es preferible eliminar dicha actividad de unión de los productos farmacéuticos de anticuerpos dirigidos a la neutralización de la actividad biológica (documento de no patente 3). Además, puesto que el receptor Fcγ es expresado en células presentadoras de antígeno, las moléculas que se unen al receptor Fcγ tienen a ser presentadas como antígenos. Se ha descrito que la inmunogenicidad es por y se puede potenciar por la unión de una proteína o péptido al dominio Fc de la IgG1 (documento de no patente 4 y documento de patente 1). Se cree que la interacción entre el dominio Fc del anticuerpo y el receptor Fcγ es causa de efectos adversos graves encontrados en ensayos clínicos de fase I de TGN1412 (documento de no patente 5). Por lo tanto, se considera que la unión al receptor Fcγ es desfavorable en productos farmacéuticos de anticuerpos dirigidos a la neutralización de la actividad biológica de un antígeno desde la perspectiva de los efectos adversos y la inmunogenicidad.

- Un método para impedir la unión al receptor Fcγ es alterar el subtipo del anticuerpo IgG de IgG1 a IgG2 o IgG4; sin embargo, este método no puede inhibir completamente la unión (documento de no patente 6). Uno de los métodos descritos para inhibir completamente la unión al receptor Fcγ es alterar artificialmente el dominio Fc. Por ejemplo, las funciones efectoras de anticuerpos anti-CD3 y anticuerpos anti-CD4 producen efectos adversos. Por lo tanto, se introdujeron aminoácidos que no están presentes en la secuencia de tipo natural en el dominio de Fc de unión al receptor Fcγ (documentos de no patente 3 y 7), y actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos para evaluar anticuerpos anti-CD3 que no se unen al receptor Fcγ y anticuerpos anti-CD4 que tienen un dominio de Fc mutado (documentos de no patente 5 y 8). Alternativamente, se pueden preparar anticuerpos que no se unen al receptor Fcγ alterando el dominio de unión a FcγR de la IgG1 (en las posiciones 233, 234, 235, 236, 327, 330 y 331 en el sistema de numeración de la UE) a una secuencia de IgG2 o IgG4 (documento de no patente 9 y documento de patente 2). Sin embargo, estas moléculas contienen nuevas secuencias de péptidos no naturales de 9 a 12 aminoácidos, que pueden constituir un péptido epítipo de linfocitos T y por lo tanto suponen riesgo de inmunogenicidad. No hay descripciones previas sobre anticuerpos que no se unen al receptor Fcγ que hayan superado estos problemas.

- A la vez, las propiedades fisicoquímicas de proteínas anticuerpos, en particular, la homogeneidad y estabilidad, son cruciales en el desarrollo de productos farmacéuticos de anticuerpos. Para el subtipo IgG2, se ha descrito heterogeneidad originada en los enlaces disulfuro en la región bisagra (documento de no patente 10 y documento de patente 3). No es fácil fabricarlos como producto farmacéutico a gran escala a la vez que se mantiene la heterogeneidad relacionada con las sustancias objetivo/sustancias relacionadas entre producciones. Por lo tanto, son deseables, tanto como sea posible, sustancias individuales para moléculas de anticuerpo desarrolladas como productos farmacéuticos.

- La IgG2 e IgG4 son inestables en condiciones ácidas. Los anticuerpos de tipo IgG en general están expuestos a condiciones ácidas en el procedimiento de purificación usando proteína A y el procedimiento de inactivación de

virus. Por lo tanto, hay que intervenir en relación con la estabilidad de la IgG2 e IgG4 durante estos procedimientos, y es preferible que las moléculas de anticuerpo desarrolladas como productos farmacéuticos sean también estables en condiciones ácidas. La IgG2 e IgG4 naturales, y los anticuerpos que no se unen al receptor Fcγ derivados de la IgG2 e IgG4 (documentos de no patente 6 y 7 y documento de patente 2) tienen dichos problemas. Es deseable resolver estos problemas cuando se desarrollan anticuerpos en productos farmacéuticos.

Los anticuerpos de tipo IgG1 son relativamente estables en condiciones ácidas y el grado de heterogeneidad originado de los enlaces disulfuro en la región bisagra también es menor en este tipo de anticuerpos. Sin embargo, se ha descrito que los anticuerpos de tipo IgG1 sufren escisión de enlace peptídico no enzimática en la región bisagra en soluciones, cuando se almacenan como formulaciones, y como resultado se generan fragmentos Fab como impurezas (documento de no patente 11). Es conveniente superar la generación de impurezas cuando se desarrollan anticuerpos en productos farmacéuticos.

Además, para la heterogeneidad de la secuencia C-terminal de un anticuerpo, se ha descrito la eliminación del resto de lisina del aminoácido C-terminal, y la amidación del grupo amino C-terminal debido a la eliminación de los dos aminoácidos C-terminales, glicina y lisina (documento de no patente 12). Es preferible eliminar dicha heterogeneidad cuando se desarrollan anticuerpos en productos farmacéuticos.

La región constante de un producto farmacéutico de anticuerpo dirigido a la neutralización de un antígeno, preferiblemente tiene una secuencia que supera todos los problemas descritos antes. Sin embargo, no se ha descrito una región constante que cumpla todos los requisitos.

Se cree que una forma preferida de administración del producto farmacéutico de anticuerpo es la formulación subcutánea en enfermedades autoinmunitarias crónicas y similares. Los productos farmacéuticos de anticuerpos convenientes, de coste bajo, que se pueden administrar por vía subcutánea en intervalos más largos, se pueden proporcionar aumentando la semivida de un anticuerpo en el plasma para prolongar su efecto terapéutico y de esta forma reducir la cantidad de proteína administrada, y confiriendo al anticuerpo estabilidad alta de modo que se puedan preparar formulaciones de concentración alta.

En general, es necesario que las formulaciones subcutáneas sean formulaciones de concentración alta. Desde la perspectiva de la estabilidad o similar, el límite de concentración de las formulaciones de anticuerpos de tipo IgG en general se cree que es aproximadamente 100 mg/ml (documento de no patente 13). Por lo tanto, es un reto asegurar la estabilidad con concentración alta. Sin embargo, no hay publicaciones sobre la mejora de la estabilidad de la IgG a concentraciones altas introduciendo sustituciones de aminoácidos en su región constante. Se ha descrito un método para prolongar la semivida del anticuerpo en el plasma y sustituye aminoácidos en la región constante (documentos de no patente 14 y 15); sin embargo, la introducción de secuencias no naturales en la región constante no es indeseable desde la perspectiva del riesgo de inmunogenicidad.

Como se ha descrito antes, cuando el fin del producto farmacéutico de anticuerpo es neutralizar un antígeno, es preferible haber superado todos los problemas descritos antes con respecto a su secuencia de la región constante. Sin embargo, no se ha descrito una región constante que cumpla todos los requisitos. Por lo tanto, se piden regiones constantes de anticuerpo que hayan superado los problemas descritos antes.

A continuación se describen documentos de las técnicas anteriores relacionadas para la presente invención.

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

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

[Documento de no patente 3] Reddy MP, Kinney CA, Chaikin MA, Payne A, Fishman-Lobell J, Tsui P, Dal Monte PR, Doyle ML, Brigham-Burke MR, Anderson D, Reff M, Newman R, Hanna N, Sweet RW, Truneh A. Elimination of Fc receptor-dependent effector functions of a modified IgG4 monoclonal antibody to human CD4. *J. Immunol.*, Feb 2000 15; 164(4):1925-33

[Documento de no patente 4] Guyre PM, Graziano RF, Goldstein J, Wallace PK, Morganelli PM, Wardwell K, Howell AL. Increased potency of Fc-receptor-targeted antigens. *Cancer Immunol. Immunother.* Nov-Dic 1997; 45(3-4):146-8

[Documento de no patente 5] Strand V, Kimberly R, Isaacs JD. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* enero 2007; 6(1):75-92

[Documento de no patente 6] Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE. The IgG Fc receptor family. *Ann. Hematol.*, Jun 1998; 76(6):231-48

[Documento de no patente 7] Cole MS, Anasetti C, Tso JY. Human IgG2 variants of chimeric anti-CD3 are nonmitogenic to T cells. *J. Immunol.* 1 Oct 1997; 159(7):3613-21

[Documento de no patente 8] Chau LA, Tso JY, Melrose J, Madrenas J. HuM291 (Nuvion), a humanized Fc receptor-

nonbinding antibody against CD3, anergizes peripheral blood T cells as partial agonist of the T cell receptor. *Transplantation*, abril 2041 15; 71(7):941-50

[Documento de no patente 9] Armour KL, Clark MR, Hadley AG, Williamson LM. Recombinant human IgG molecules lacking Fcγ receptor I binding and monocyte triggering activities. *Eur. J. Immunol.*, agosto 1999; 29(8):2613-24

- 5 [Documento de no patente 10] Chu GC, Chelius D, Xiao G, Khor HK, Coulibaly S, Bondarenko PV. Accumulation of Succinimide in a Recombinant Monoclonal Antibody in Mildly Acidic Buffers Under Elevated Temperatures. *Pharm. Res.* 24 marzo 2007, 24; 24(6):1145-56

[Documento de no patente 11] AJ Cordoba, BJ Shyong, D Breen, RJ Harris. Nonenzymatic hinge region fragmentation of antibodies in solution. *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biome. Life Sci.* (2005) 818, 115-121

- 10 [Documento de no patente 12] Johnson KA, Paisley-Flango K, Tangarone BS, Porter TJ, Rouse JC. Cation exchange-HPLC and mass spectrometry reveal C-terminal amidation of an IgG1 heavy chain. *Anal. Biochem.*, 1 enero 2007; 360(1):75-83

[Documento de no patente 13] Shire SJ, Shahrokh Z, Liu J. Challenges in the development of high protein concentration formulations. *J. Pharm. Sci.*, junio 2004; 93(6):1390-402

- 15 [Documento de no patente 14] Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N. An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life. *J. Immunol.*, 1 enero 2006; 176(1):346-56

[Documento de no patente 15] 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.*, Jul 1997; 15(7):637-40

- 20 [Documento de patente 1] US 20050261229A1

[Documento de patente 2] WO 99/58572

[Documento de patente 3] US 2006/0194280

Descripción de la invención

Problemas a resolver por la invención

- 25 La invención se llevó a cabo en vista de las circunstancias anteriores. Un objetivo de la invención es proporcionar regiones constantes de anticuerpos que tengan mejores propiedades fisicoquímicas (estabilidad y homogeneidad), inmunogenicidad, seguridad y farmacocinéticas (retención en el plasma (sangre)) por alteración de los aminoácidos.

Medios para resolver los problemas

- 30 Se llevaron a cabo estudios específicos para generar regiones constantes de anticuerpos que mejoren por alteración de sus secuencias de aminoácidos y tengan mejores propiedades fisicoquímicas (estabilidad y homogeneidad), inmunogenicidad y seguridad y farmacocinéticas. Como resultado, se mejoraron con éxito regiones constantes de anticuerpos para tener mayor estabilidad en condiciones ácidas, menor heterogeneidad originada en los enlaces disulfuro en la región bisagra, menor heterogeneidad originada en el extremo C de la cadena H y mayor estabilidad a concentraciones altas, y también se descubrieron nuevas secuencias de la región constante que tienen menor actividad de unión al receptor Fcγ mientras que se minimizaba la generación de nuevos péptidos epítopos de linfocitos T.

- 35 La invención se refiere a regiones constantes de anticuerpos que son superiores en términos de seguridad, riesgo de inmunogenicidad, propiedades fisicoquímicas (estabilidad y homogeneidad) y farmacocinética, una mejora por la alteración de aminoácidos; anticuerpos que comprenden dicha región constante de anticuerpo; composiciones farmacéuticas que comprenden dicho anticuerpo; y métodos para producirlos. Más específicamente, la invención proporciona:

[1] una región constante de anticuerpo humano de uno cualquiera de:

- 45 (a) una región constante de anticuerpo humano que comprende eliminaciones tanto de Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración EU) como de Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y

(b) una región constante de anticuerpo humano que comprende eliminaciones tanto de Gly en la posición 326 (posición 446 en el sistema de numeración EU) como de Lys en la posición 327 (posición 447 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;

- 50 [2] La región constante de [1](a) en la que los aminoácidos en las posiciones 209 (posición 330 en el sistema de numeración EU), 210 (posición 331 en el sistema de numeración EU), 218 (posición 339 en el sistema de

numeración EU), 276 (posición 397 en el sistema de numeración EU), 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU) y 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, se han sustituido por otros aminoácidos;

[3] una región constante de IgG2 en la que los aminoácidos en las posiciones 276 (posición 397 en el sistema de numeración EU), 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), y 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, se han sustituido por otros aminoácidos, y que además comprende eliminaciones tanto de la Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración EU) como de Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración EU);

[4] una región constante de IgG2 en la que la Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU), His en la posición 147 (posición 268 en el sistema de numeración EU), Arg en la posición 234 (posición 355 en el sistema de numeración EU), y Gln en la posición 298 (posición 419 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, se han sustituido por otros aminoácidos, y que además comprende eliminaciones tanto de la Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración EU) como de Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración EU);

[5] una región constante de IgG2 en la que la Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU), His en la posición 147 (posición 268 en el sistema de numeración EU), Arg en la posición 234 (posición 355 en el sistema de numeración EU), Gln en la posición 298 (posición 419 en el sistema de numeración EU), y Asn en la posición 313 (posición 434 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, se han sustituido por otros aminoácidos, y que además comprende eliminaciones tanto de la Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración EU) como de Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración EU);

[6] una región constante la IgG4 en la que los aminoácidos en la posición 289 (posición 409 en el sistema de numeración EU), posiciones 14, 16, 20, 21, 97, 100, 102, 103, 104 y 105 (posiciones 131, 133, 137, 138, 214, 217, 219, 220, 221 y 222 en el sistema de numeración EU, respectivamente), y posiciones 113, 114 y 115 (posiciones 233, 234 y 235 en el sistema de numeración EU, respectivamente), se han sustituido por otros aminoácidos, y el aminoácido en la posición 116 (posición 236 en el sistema de numeración EU) se ha eliminado de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y que además comprende eliminaciones tanto de la Gly en la posición 326 (posición 446 en el sistema de numeración EU) como de Lys en la posición 327 (posición 447 en el sistema de numeración EU);

[7] una región constante de IgG2 en la que la Ala en la posición 209 (posición 330 en el sistema de numeración EU), Pro en la posición 210 (posición 331 en el sistema de numeración EU), Thr en la posición 218 (posición 339 en el sistema de numeración EU), Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), y Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se han sustituido por otros aminoácidos, y que además comprende eliminaciones tanto de la Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración EU) como de Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración EU);

[8] una región constante de IgG2 en la que la Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), y Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se han sustituido por otros aminoácidos, y que además comprende eliminaciones tanto de la Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración EU) como de Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración EU);

[9] una región constante de anticuerpo humano de [1] que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5;

[10] una región constante de anticuerpo humano de [1] que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;

[11] una región constante de anticuerpo humano de [1] que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;

[12] una región constante de anticuerpo humano de [1] que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35;

[13] una región constante de anticuerpo humano de [1] que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37;

[14] una región constante de anticuerpo humano de [1] que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 (M40ΔGK);

5 [15] una región constante de anticuerpo humano de [1] que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 (M86ΔGK);

[16] un anticuerpo que comprende la región constante de uno cualquiera de [1] a [15];

[17] un anticuerpo anti-receptor de IL-6 que comprende la región constante de uno cualquiera de [1] a [15]; y

[18] una composición farmacéutica que comprende la región constante de uno cualquiera de [1] a [15].

10 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica que muestra el resultado de usar cromatografía de filtración en gel para analizar el contenido de agregados en WT-IgG1, WT-IgG2, WT-IgG4, IgG2-M397V y IgG4-R409K purificados por elución con ácido clorhídrico.

15 La figura 2 es un diagrama que muestra el resultado del análisis por cromatografía de intercambio catiónico (IEC) de WT-IgG1, WT-IgG2 y WT-IgG4.

La figura 3 es un diagrama que muestra los enlaces disulfuro previstos en la región bisagra de la WT-IgG2.

La figura 4 es un diagrama que muestra los enlaces disulfuro previstos en la región bisagra de la IgG2-SKSC.

La figura 5 es un diagrama que muestra el resultado del análisis por cromatografía de intercambio catiónico (IEC) de WT-IgG2 y IgG2-SKSC.

20 La figura 6 es un diagrama que muestra el resultado del análisis por cromatografía de intercambio catiónico (IEC) del anticuerpo PM-1 humanizado, anticuerpo ΔK C-terminal de cadena H, y anticuerpo ΔGK C-terminal de cadena H.

La figura 7 muestra la comparación de las cantidades de WT-IgG1, WT-IgG2, WT-IgG4, WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK, y WT-M11ΔGK unidos a FcγRI.

25 La figura 8 es una gráfica que muestra la comparación de las cantidades de WT-IgG1, WT-IgG2, WT-IgG4, WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK y WT-M11ΔGK unidos a FcγRIIa.

La figura 9 es una gráfica que muestra la comparación de las cantidades de WT-IgG1, WT-IgG2, WT-IgG4, WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK y WT-M11ΔGK unidos a FcγRIIb.

La figura 10 es una gráfica que muestra la comparación de las cantidades de WT-IgG1, WT-IgG2, WT-IgG4, WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK y WT-M11ΔGK unidos a FcγRIIIa (Val).

30 La figura 11 es una gráfica que muestra el aumento de agregación en un ensayo de estabilidad para WT-IgG1, WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK y WT-M11ΔGK en concentraciones altas.

La figura 12 es una gráfica que muestra el aumento de fragmentos Fab en un ensayo de estabilidad para WT-IgG1, WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK y WT-M11ΔGK en concentraciones altas.

35 La figura 13 es un diagrama que muestra el resultado del análisis por cromatografía de intercambio catiónico (IEC) de WT-IgG2, WT-M14ΔGK y WT-M31ΔGK.

La figura 14 es una gráfica que muestra la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de WT-IgG1 y WT-M14 después de administración intravenosa a ratones transgénicos con FcRn humano.

La figura 15 es una gráfica que muestra la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de WT-IgG1, WT-M44, WT-M58 y WT-M73 después de administración intravenosa a ratones transgénicos con FcRn humano.

40 La figura 16 es un diagrama que muestra una evaluación basada en cromatografía de intercambio catiónico del efecto en la heterogeneidad de la región constante de anticuerpos anti-receptor de IL-6 WT y F2H/L39, anticuerpo H0L0anti-receptor IL-31, y anticuerpo DNS anti-RANKL.

45 La figura 17 es un diagrama que muestra una evaluación basada en cromatografía de intercambio catiónico del efecto en la heterogeneidad del dominio de cisteína de CH1 de anticuerpos anti-receptor de IL-6 de tipo natural y F2H/L39.

La figura 18 es un diagrama que muestra la evaluación basada en DSC del efecto en el máximo de

desnaturalización del dominio de cisteína de CH1 del anticuerpos anti-receptor de IL-6 WT y F2H/L39.

La figura 19 es una gráfica que muestra las actividades de TOCILIZUMAB, el control y Fv5-M83 para neutralizar BaF/gp130.

5 La figura 20 es una gráfica que muestra las actividades de TOCILIZUMAB, Fv3-M73 y Fv4-M73 para neutralizar BaF/gp130.

La figura 21 es una gráfica que muestra la evolución temporal de la concentración plasmática de TOCILIZUMAB, el control, Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 en macacos cangrejeros después de administración intravenosa.

La figura 22 es una gráfica que muestra la evolución temporal de la concentración de CRP en macacos cangrejeros después de administración intravenosa de TOCILIZUMAB, el control, Fv3-M73, Fv4-M73 o Fv5-M83.

10 La figura 23 una gráfica que muestra la evolución temporal de la concentración del receptor de IL-6 soluble libre en macacos cangrejeros después de administración intravenosa de TOCILIZUMAB, el control, Fv3-M73, Fv4-M73 o Fv5-M83.

La figura 24 es una gráfica que muestra la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de WT-IgG1, WT-M14 y WT-M58 después de administración intravenosa a ratones transgénicos con FcRn humano.

15 Modo de llevar a cabo la invención

La invención proporciona regiones constantes de anticuerpos cuyas propiedades fisicoquímicas (estabilidad y homogeneidad), inmunogenicidad, seguridad y/o farmacocinética se han mejorado alterando la secuencia de aminoácidos de una región constante de anticuerpo; anticuerpos que comprenden dicha región constante; composiciones farmacéuticas que comprenden dicho anticuerpo; y métodos para producirlos.

20 En la presente memoria, la región constante se refiere a la región constante de tipo IgG1, IgG2 o IgG4. La región constante de anticuerpo preferiblemente es una región constante de anticuerpo humano. Las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de la IgG1, IgG2 e IgG4 humanas son conocidas (región constante de la IgG1 humana, SEQ ID NO: 1; región constante de la IgG1 humana, SEQ ID NO: 2; y región constante de la IgG4 humana, SEQ ID NO: 3). Las regiones constantes de anticuerpos que contienen sustituciones de aminoácidos de la invención, pueden comprender otras sustituciones o modificaciones de aminoácidos siempre que comprenden las sustituciones de aminoácidos de la invención. Por lo tanto, las regiones constantes de la IgG2 que comprendan las sustituciones de aminoácidos de la invención en la región constante de la IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 incluyen regiones constantes de IgG2 que comprenden una o más sustituciones y/o modificaciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y además comprenden las sustituciones de aminoácidos de la invención, así como las regiones constantes de la IgG2 que comprenden las sustituciones de aminoácidos de la presente invención y además comprenden una o más sustituciones y/o modificaciones de aminoácidos. Se aplica lo mismo a las regiones constantes de IgG1 que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y las regiones constantes de IgG4 que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. La secuencia de la región constante de la IgG4 humana se ha alterado para mejorar la estabilidad de la región bisagra (*Mol. Immunol.*, enero 1993;30(1):105-8). Además, la cadena de azúcar en la posición 297 en el sistema de numeración EU puede ser de cualquier estructura de cadena de azúcar, o puede no haber ninguna cadena de azúcar unida en este sitio (por ejemplo, puede ser producida con *E. coli*).

IgG2 que tiene aminoácidos alterados

La descripción se refiere a regiones constantes de IgG2 con una mejor estabilidad en condiciones ácidas.

40 Más específicamente, la descripción se refiere a regiones constantes de IgG2 en las que la Met en la posición 276 (posición 397 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, se ha sustituido por otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución por Val. La estabilidad del anticuerpo en condiciones ácidas se puede mejorar sustituyendo la Met en la posición 276 (posición 397 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido.

Las regiones constantes de IgG2 proporcionadas por la descripción, que tienen una mejor estabilidad en condiciones ácidas, también pueden tener otras sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos, siempre que tengan al menos la sustitución de aminoácido descrita antes.

La descripción se refiere a regiones constantes de IgG2 con menor heterogeneidad de la región bisagra.

50 Más específicamente, la descripción se refiere a regiones constantes de IgG2 en las que la Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), y/o Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se han sustituido por otros aminoácidos. El tipo de aminoácido después de sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren las sustituciones de Cys por Ser en la posición 14 (posición 131

en el sistema de numeración EU), Arg por Lys en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), y Cys por Ser en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU) (IgG2-SKSC).

Estas sustituciones pueden reducir la heterogeneidad originada en la región bisagra de la IgG2. Las regiones constantes de IgG2 descritas en la presente memoria que comprenden sustituciones de aminoácidos incluyen regiones constantes de IgG2 que comprenden al menos uno de los tres tipos de sustituciones de aminoácidos descritas antes; sin embargo, las regiones constantes de IgG2 preferiblemente comprenden sustituciones de Cys en la posición 14 y Cys en la posición 102 por otros aminoácidos, o los tres tipos de sustituciones de aminoácidos descritos antes.

Las regiones constantes de IgG2 proporcionadas por la descripción, que tienen menor heterogeneidad, también pueden tener otras sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos, siempre que tengan al menos la sustitución de aminoácido descrita antes.

Por ejemplo, la mutación de la Cys en la posición 14 y la Arg en la posición 16 en una región constante de IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, puede generar secuencias de péptidos nuevas, no naturales, de 9 a 12 aminoácidos, que pueden convertirse en péptidos epítopos de linfocitos T, y por lo tanto, generar riesgo de inmunogenicidad. Incluso con la introducción de las sustituciones de aminoácidos descritas antes, la generación de péptidos epítopos de linfocitos T no naturales se puede evitar por la sustitución de la Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU) y la Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU) por otros aminoácidos. El tipo de aminoácido después de sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren las sustituciones de Glu por Gly en la posición 20 y de Ser por Gly en la posición 21.

La descripción también se refiere a regiones constantes de IgG2 con menor actividad de unión al receptor Fcγ.

Más específicamente, la descripción se refiere a regiones constantes de IgG2 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que la Ala en la posición 209 (EU330), Pro en la posición 210 (EU331), y/o Thr en la posición 218 (EU339) de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, se han sustituido por Ser, Ser y Ala, respectivamente. Las sustituciones para la Ala en la posición 209 (EU330) y para la Pro en la posición 210 (EU331) ya se han descrito para permitir el impedimento de la unión del receptor Fcγ (*Eur. J. Immunol.*, agosto 1999; 29(8):2613-24). Sin embargo, desde el punto de vista del riesgo de inmunogenicidad, estas alteraciones no se prefieren porque dan como resultado la generación de péptidos derivados no humanos que se pueden convertir en epítopos de linfocitos T. Sin embargo, la unión al receptor Fcγ de la IgG2 se puede reducir sustituyendo la Thr por Ala en la posición 218 (EU339) al mismo tiempo, y los péptidos de 9-12 aminoácidos que se convierten en epítopos de linfocitos T tienen solo origen humano.

Las regiones constantes de IgG2 descritas en la presente memoria que comprenden sustituciones de aminoácidos, comprenden al menos uno de los tres tipos de sustituciones de aminoácidos descritas antes; sin embargo, las regiones constantes de IgG2 preferiblemente comprenden los tres tipos de sustituciones de aminoácidos descritas antes. En una realización preferida, las regiones constantes de IgG2 descritas en la presente memoria que comprenden sustituciones de aminoácidos, incluyen regiones constantes de IgG2 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que la Ala en la posición 209 (EU330), Pro en la posición 210 (EU331), y Thr en la posición 218 (EU339) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se han sustituido por Ser, Ser y Ala, respectivamente.

Las regiones constantes de IgG2 descritas en la presente memoria, que tienen menor actividad de unión al receptor Fcγ, también pueden tener otras sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos, siempre que tengan al menos la sustitución de aminoácido descrita antes.

La descripción se refiere a regiones constantes de IgG2 con menor heterogeneidad C-terminal.

Más específicamente, la descripción se refiere a regiones constantes de IgG2 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que la Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración EU) y la Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración EU) se han eliminado en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. La heterogeneidad originada en el extremo C de la cadena H del anticuerpo se puede reducir solo cuando se han eliminado ambos aminoácidos.

Las regiones constantes de IgG2 descritas en la presente memoria, que tienen menor heterogeneidad C-terminal, también pueden tener otras sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos, siempre que tengan al menos la sustitución de aminoácido descrita antes.

La descripción se refiere además a regiones constantes de IgG2 con mejor farmacocinética.

Específicamente, la descripción se refiere a regiones constantes de IgG2 en las que la His en la posición 147 (posición 268 en el sistema de numeración EU), Arg en la posición 234 (posición 355 en el sistema de numeración EU) y Gln en la posición 298 (posición 419 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se han sustituido por otros aminoácidos. Estas sustituciones de aminoácidos permiten mejorar la

farmacocinética del anticuerpo. El tipo de aminoácido después de sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren sustituciones de His por Gln en la posición 147 (posición 268 en el sistema de numeración EU), Arg por Gln en la posición 234 (posición 355 en el sistema de numeración EU) y Gln por Glu en la posición 298 (posición 419 en el sistema de numeración EU). Las regiones constantes de IgG2 con las sustituciones de aminoácidos descritas en la presente memoria incluyen regiones constantes de IgG2 que comprenden al menos uno de los tres tipos de sustituciones de aminoácidos descritas antes; sin embargo, las regiones constantes de IgG2 preferiblemente comprenden los tres tipos de sustituciones de aminoácidos descritas antes.

Más adelante hay una realización preferida de la IgG2 descrita en la presente memoria, que tiene mejor estabilidad en condiciones ácidas, menor heterogeneidad en la región bisagra y/o menor actividad de unión al receptor Fcγ.

Los anticuerpos que comprenden una región constante de IgG2 comprenden una secuencia de aminoácidos en la que la Ala en la posición 209, Pro en la posición 210, Thr en la posición 218, Met en la posición 276, Cys en la posición 14, Arg en la posición 16, Cys en la posición 102, Glu en la posición 20, y Ser en la posición 21 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se han sustituido por otros aminoácidos.

El tipo de aminoácido después de sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren las sustituciones de Ala por Ser en la posición 209 (posición 330 en el sistema de numeración EU), Pro por Ser en la posición 210 (posición 331 en el sistema de numeración EU), Thr por Ala en la posición 218 (posición 339 en el sistema de numeración EU), Met por Val en la posición 276 (posición 397 en el sistema de numeración EU), Cys por Ser en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg por Lys en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), Cys por Ser en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), Glu por Gly en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), y Ser por Gly en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU).

Dichas regiones constantes de IgG2 incluyen, por ejemplo, las regiones constantes de IgG2 que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (M14).

En otra realización preferida, las regiones constantes de IgG2 descritas en la presente memoria incluyen regiones constantes de IgG2 que resultan de la eliminación de la Gly en la posición 325 y la Lys en la posición 326 en las regiones constantes de IgG2 descritas antes, para reducir la heterogeneidad C-terminal. Dichos anticuerpos incluyen, por ejemplo, IgG2 que comprende una región constante que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (M14ΔGK).

Más adelante hay una realización preferida de la IgG2 descrita en la presente memoria, que tiene menor heterogeneidad en la región bisagra y/o menor actividad de unión al receptor Fcγ.

Los anticuerpos que comprenden una región constante de IgG2 comprenden una secuencia de aminoácidos en la que la Ala en la posición 209, Pro en la posición 210, Thr en la posición 218, Cys en la posición 14, Arg en la posición 16, Cys en la posición 102, Glu en la posición 20, y Ser en la posición 21 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se han sustituido por otros aminoácidos.

El tipo de aminoácido después de sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren las sustituciones de Ala por Ser en la posición 209 (posición 330 en el sistema de numeración EU), Pro por Ser en la posición 210 (posición 331 en el sistema de numeración EU), Thr por Ala en la posición 218 (posición 339 en el sistema de numeración EU), Cys por Ser en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg por Lys en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), Cys por Ser en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), Glu por Gly en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), y Ser por Gly en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU).

Dichas regiones constantes de IgG2 incluyen, por ejemplo, las regiones constantes de IgG2 que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54 (M86).

En otra realización preferida, las regiones constantes de IgG2 descritas en la presente memoria incluyen regiones constantes de IgG2 que resultan de la eliminación de la Gly en la posición 325 y la Lys en la posición 326 en las regiones constantes de IgG2 descritas antes, para reducir la heterogeneidad C-terminal. Dichos anticuerpos incluyen, por ejemplo, IgG2 que comprende una región constante que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 (M86ΔGK).

Más adelante hay otra realización preferida de las regiones constantes de IgG2 descritas en la presente memoria, que tiene mejor estabilidad en condiciones ácidas y menor heterogeneidad en la región bisagra.

Las regiones constantes de IgG2 comprenden una secuencia de aminoácidos en la que la Met en la posición 276, Cys en la posición 14, Arg en la posición 16, Cys en la posición 102, Glu en la posición 20 y Ser en la posición 21 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se han sustituido por otros aminoácidos.

El tipo de aminoácido después de sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren las sustituciones de Met por Val en la posición 276 (posición 397 en el sistema de numeración EU), Cys por Ser en la

posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg por Lys en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), Cys por Ser en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), Glu por Gly en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), y Ser por Gly en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU).

- 5 Dichas regiones constantes de IgG2 incluyen, por ejemplo, las regiones constantes de IgG2 que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (M31).

En otra realización preferida, las regiones constantes de IgG2 descritas en la presente memoria incluyen regiones constantes de IgG2 que comprenden además la eliminación de la Gly en la posición 325 y la Lys en la posición 326 en las regiones constantes de IgG2 descritas antes. Dichos anticuerpos incluyen, por ejemplo, regiones constantes de IgG2 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (M31ΔGK).

Más adelante hay una realización preferida de las regiones constantes de IgG2 descritas en la presente memoria, que tiene menor heterogeneidad en la región bisagra.

Las regiones constantes de IgG2 comprenden una secuencia de aminoácidos en la que la Cys en la posición 14, Arg en la posición 16, Cys en la posición 102, Glu en la posición 20 y Ser en la posición 21 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se han sustituido por otros aminoácidos.

El tipo de aminoácido después de sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren las sustituciones de Cys por Ser en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg por Lys en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), Cys por Ser en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), Glu por Gly en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), y Ser por Gly en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU).

Dichas regiones constantes de IgG2 incluyen, por ejemplo, las regiones constantes de IgG2 que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 (M40).

En otra realización preferida, las regiones constantes de IgG2 descritas en la presente memoria incluyen regiones constantes de IgG2 que comprenden además la eliminación de la Gly en la posición 325 y la Lys en la posición 326 en las regiones constantes de IgG2 descritas antes. Dichos anticuerpos incluyen, por ejemplo, regiones constantes de IgG2 que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 (M40ΔGK).

La descripción se refiere a regiones constantes de IgG2 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que la Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU), His en la posición 147 (posición 268 en el sistema de numeración EU), Arg en la posición 234 (posición 355 en el sistema de numeración EU), y Gln en la posición 298 (posición 419 en el sistema de numeración EU), se han sustituido por otros aminoácidos, y simultáneamente la Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración EU) y la Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración EU) se han eliminado en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

El tipo de aminoácido después de sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren las sustituciones de Cys por Ser en la posición 14, Arg por Lys en la posición 16, Cys por Ser en la posición 102, Glu por Gly en la posición 20, Ser por Gly en la posición 21, His por Gln en la posición 147, Arg por Gln en la posición 234 y Gln por Glu en la posición 298.

- 40 Específicamente, la descripción se refiere a una región constante de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 35 (M58).

La descripción se refiere a regiones constantes de IgG2 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que la Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU), His en la posición 147 (posición 268 en el sistema de numeración EU), Arg en la posición 234 (posición 355 en el sistema de numeración EU), Gln en la posición 298 (posición 419 en el sistema de numeración EU) y Asn en la posición 313 (posición 434 en el sistema de numeración EU), se han sustituido por otros aminoácidos, y simultáneamente la Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración EU) y la Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración EU) se han eliminado en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

El tipo de aminoácido después de sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren las sustituciones de Cys por Ser en la posición 14, Arg por Lys en la posición 16, Cys por Ser en la posición 102, Glu por Gly en la posición 20, Ser por Gly en la posición 21, His por Gln en la posición 147, Arg por Gln en la posición 234, Gln por Glu en la posición 298 y Asn por Ala en la posición 313.

Específicamente, la descripción se refiere a una región constante de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 (M73).

- 5 Estas regiones constantes de anticuerpos se han optimizado para tener menor actividad de unión al receptor Fcγ, menor riesgo de inmunogenicidad, mejor estabilidad en condiciones ácidas, menor heterogeneidad, mejor farmacocinética, y/o mayor estabilidad en las preparaciones en comparación con la región constante de la IgG1.

IgG4 que tiene aminoácidos alterados

La descripción se refiere a regiones constantes de IgG4 que son estables en condiciones ácidas.

- 10 Más específicamente, la descripción se refiere a regiones constantes de IgG4 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que Arg en la posición 289 (posición 409 en el sistema de numeración EU) de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 se ha sustituido por otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución por Lys. La estabilidad del anticuerpo en condiciones ácidas se puede mejorar sustituyendo la Arg en la posición 277 (posición 409 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 por otro aminoácido.

- 15 Las regiones constantes de IgG4 descritas en la presente memoria que tienen mejor estabilidad en condiciones ácidas, también pueden tener otras sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos, siempre que tengan al menos la sustitución de aminoácido descrita antes.

La descripción se refiere a regiones constantes de IgG4 con menor heterogeneidad C-terminal.

- 20 La descripción se refiere a regiones constantes de IgG4 en las que la Gly en la posición 326 (posición 446 en el sistema de numeración EU) y la Lys en la posición 327 (posición 447 en el sistema de numeración EU) se han eliminado en la región constante de IgG4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. La heterogeneidad originada en el extremo C de la cadena H de anticuerpo se puede reducir solo cuando se eliminan ambos aminoácidos.

- 25 Las regiones constantes de IgG4 descritas en la presente memoria, que tienen menor heterogeneidad C-terminal, también pueden tener otras sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos, siempre que tengan al menos la sustitución de aminoácido descrita antes.

Otra realización preferida de la IgG4 descrita en la presente memoria, que tiene mejor estabilidad en condiciones ácidas, menor heterogeneidad en la región bisagra y/o menor actividad de unión al receptor Fcγ, incluye la IgG4 que comprende la región constante descrita a continuación.

- 30 Regiones constantes de IgG4 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que Cys en la posición 14, Arg en la posición 16, Glu en la posición 20, Ser en la posición 21, Arg en la posición 97, Ser en la posición 100, Tyr en la posición 102, Gly en la posición 103, Pro en la posición 104, Pro en la posición 105, Glu en la posición 113, Phe en la posición 114, Leu en la posición 115, y Arg en la posición 289 se han sustituido por otros aminoácidos, y simultáneamente la Gly en la posición 116 se ha eliminado en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

- 35 El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren las sustituciones de Cys por Ser en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg por Lys en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), Glu por Gly en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), Ser por Gly en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU), Arg por Thr en la posición 97 (posición 214 en el sistema de numeración EU), Ser por Arg en la posición 100 (posición 217 en el sistema de numeración EU), Tyr por Ser en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), Gly por Cys en la posición 103 (posición 220 en el sistema de numeración EU), Pro por Val en la posición 104 (posición 221 en el sistema de numeración EU), Pro por Glu en la posición 105 (posición 222 en el sistema de numeración EU), Glu por Pro en la posición 113 (posición 233 en el sistema de numeración EU), Phe por Val en la posición 114 (posición 234 en el sistema de numeración EU), Leu por Ala en la posición 115 (posición 235 en el sistema de numeración EU), y Arg por Lys en la posición 289 (posición 409 en el sistema de numeración EU).

- 45 Dichas regiones constantes de IgG4 incluyen, por ejemplo, regiones constantes de IgG4 que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 (M11).

- 50 En otra realización preferida, las regiones constantes de IgG4 descritas en la presente memoria incluyen regiones constantes de IgG4 que además comprenden la eliminación de la Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración EU) y la Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración EU) en la región constante de IgG4 descrita antes. Dichos anticuerpos incluyen, por ejemplo, regiones constantes de IgG4 que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 (M11ΔGK).

IgG1 que tiene aminoácidos alterados

La descripción se refiere a regiones constantes de IgG1 con menor heterogeneidad C-terminal.

Más específicamente, la descripción se refiere a regiones constantes de IgG1 que tienen eliminación de la Gly en la posición 329 (posición 446 en el sistema de numeración EU) y la Lys en la posición 330 (posición 447 en el sistema de numeración EU) en la región constante de IgG1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. La heterogeneidad originada en el extremo C de la cadena H de un anticuerpo, se puede reducir solo cuando se eliminan ambos aminoácidos.

La descripción se refiere a las regiones constantes de IgG1 con mejor farmacocinética.

La descripción se refiere a regiones constantes de IgG1 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que Asn en la posición 317 (posición 434 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 se ha sustituido por otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución por Ala.

La descripción se refiere a una región constante que tiene eliminación de la Gly en la posición 329 y la Lys en la posición 330 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ED NO: 36. Más específicamente, la descripción se refiere a una región constante de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43 (M83).

Las regiones constantes de IgG1 descritas en la presente memoria, que tienen menor heterogeneidad C-terminal, también pueden tener otras sustituciones, eliminaciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos, siempre que tengan al menos las eliminaciones de aminoácidos descritas antes.

La descripción también se refiere a anticuerpos que comprenden una cualquiera de las regiones constantes de anticuerpo descritas antes. El tipo y origen de los anticuerpos descritos en la presente memoria no están particularmente limitados, siempre que comprendan la región constante de anticuerpo descrita antes, y pueden ser cualquier anticuerpo.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria también incluyen productos modificados de anticuerpos que comprenden cualquiera de las sustituciones de aminoácidos descritas antes. El origen de los anticuerpos no está particularmente limitado. Los anticuerpos incluyen anticuerpos humanos, de ratón, rata, y conejo. Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden ser quiméricos, humanizados, anticuerpos totalmente humanizados, o similares. En una realización preferida, los anticuerpos descritos en la presente memoria son anticuerpos humanizados.

Alternativamente, las regiones constantes de anticuerpos descritas antes y/o moléculas de anticuerpos que comprenden una región constante de anticuerpo descrita antes, se pueden unir en una forma de molécula de fusión Fc a molécula de unión de tipo anticuerpo (moléculas armazón), péptidos bioactivos, péptidos de unión, o similares.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria también incluyen productos de modificación de un anticuerpo que comprende una cualquiera de las regiones constantes descritas antes.

Dichos productos de modificación de anticuerpos incluyen, por ejemplo, anticuerpos unidos a diferentes moléculas tales como polietilenglicol (PEG) y sustancias citotóxicas. Dichos productos de modificación de anticuerpos se pueden obtener modificando químicamente anticuerpos descritos en la presente memoria.

Los métodos para modificar anticuerpos ya están establecidos en este campo.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria también pueden ser anticuerpos biespecíficos. "Anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene en una sola molécula regiones variables que reconocen diferentes epítomos. Los epítomos pueden estar presentes en una sola molécula o en moléculas separadas.

Las regiones constantes de anticuerpos descritas antes se pueden usar como una región constante en un anticuerpo contra un antígeno arbitrario. El antígeno no está particularmente limitado.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria también se pueden obtener, por ejemplo, por los siguientes métodos. En una realización para obtener los anticuerpos descritos en la presente memoria, primero se eliminan o sustituyen uno o más restos de aminoácidos por otros aminoácidos de interés en la región constante. Los métodos para sustituir uno o más restos de aminoácidos por aminoácidos de interés incluyen, por ejemplo, la mutagénesis dirigida (Hashimoto-Gotoh, T., Mizuno, T., Ogasahara, Y., y Nakagawa, M. "An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis". *Gene* (1995) 152, 271-275; Zoller, M. J., y Smith, M. "Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors". *Methods Enzymol.* (1983) 100,468-500; Kramer, W., Drutsa, V., Jansen, H. W., Kramer, B., Pflugfelder, M., y Fritz, H. J. "The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction". *Nucleic Acids Res.* (1984) 12, 9441-9456; Kramer W., y Fritz H. J. "Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA Methods". *Enzymol.* (1987) 154, 350-367; Kunkel, T. A. "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82, 488-492). Estos métodos se pueden usar para sustituir aminoácidos diana en la región constante de un anticuerpo por aminoácidos de interés.

En otra realización para obtener anticuerpos, un anticuerpo que se une a un antígeno de interés se prepara primero

por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Cuando el anticuerpo preparado se obtiene de un animal no humano, se puede humanizar. La actividad de unión del anticuerpo se puede determinar por métodos conocidos. Después, uno o más restos de aminoácidos en la región constante se eliminan o se sustituyen por aminoácidos de interés.

5 Más específicamente, la descripción se refiere a métodos para producir anticuerpos, que comprenden las etapas de:

(a) expresar un ADN que codifica una cadena H en la que uno o más restos de aminoácidos en la región constante se han eliminado o sustituido por aminoácidos de interés, y un ADN que codifica una cadena L; y

(b) recoger los productos de expresión de la etapa (a).

10 La primera etapa de los métodos de producción descritos en la presente memoria es expresar una ADN que codifica una cadena H en la que uno o más restos de aminoácidos en la región constante se han eliminado o sustituido por aminoácidos de interés, y un ADN que codifica una cadena L de anticuerpo. Un ADN que codifica una cadena H en la que uno o más restos de aminoácidos en la región constante se han eliminado o sustituido por aminoácidos de interés, se puede preparar, por ejemplo, obteniendo un ADN que codifica la región constante de una cadena H de tipo natural, e introduciendo una sustitución adecuada de modo que un codón que codifica un aminoácido particular
15 en la región constante codifica un aminoácido de interés.

Alternativamente, un ADN que codifica una cadena H en la que uno o más restos de aminoácidos en la región constante se han eliminado o sustituido por aminoácidos de interés, también se puede preparar diseñando y después sintetizando químicamente un ADN que codifica una proteína en la que uno o más restos de aminoácidos en la región constante de la cadena H de tipo natural se han eliminado o sustituido por aminoácidos de interés.

20 El tipo de sustitución de aminoácido incluye las sustituciones descritas en la presente memoria, pero no se limitan a las mismas.

Alternativamente, un ADN que codifica una cadena H en la que uno o más restos de aminoácidos en la región constante se han eliminado o sustituido por aminoácidos de interés, también se puede preparar como una combinación de ADN parciales. Dichas combinaciones de ADN parciales incluyen, por ejemplo, la combinación de
25 un ADN que codifica una región variable y un ADN que codifica una región constante, y la combinación de un ADN que codifica una región Fab y un ADN que codifica una región Fc, pero no se limitan a las mismas. Un ADN que codifica una cadena L también se puede preparar como una combinación de ADN parciales.

Los métodos para expresar los ADN descritos antes incluyen los métodos descritos a continuación. Por ejemplo, se construye un vector de expresión de una cadena H insertando una ADN que codifica una región variable de la
30 cadena H en un vector de expresión junto con un ADN que codifica una región constante de la cadena H. Igualmente, un vector de expresión de la cadena L se construye insertando un ADN que codifica una región variable de la cadena L en un vector de expresión junto con un ADN que codifica una región constante de la cadena L. Alternativamente, estos genes de las cadenas H y L se pueden insertar en un solo vector. Los vectores de expresión incluyen, por ejemplo, vectores basados en el virus SV40, vectores basados en el virus EB y vectores basados en el
35 BPV (papilomavirus), pero no se limita a los mismos.

Las células hospedantes se cotransforman con un vector de expresión de anticuerpo construido por los métodos descritos antes. Dichas células hospedantes incluyen las células descritas antes tales como células CHO (ovario de hámster Chino) así como microorganismos tales como *E. coli*, levadura, y *Bacillus subtilis*, y plantas y animales (*Nature Biotechnology* (2007) 25, 563-565; *Nature Biotechnology* (1998) 16, 773-777; *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1999) 255, 444-450; *Nature Biotechnology* (2005) 23, 1159-1169; *Journal of Virology* (2001) 75, 2803-2809; *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2003) 308, 94-100). La transformación se puede lograr preferiblemente usando electroporación, el método de la lipofectina (R. W. Malone et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1989) 86, 6077; P. L. Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987) 84, 7413), método del fosfato de calcio (F. L. Graham y A. J. van der Eb, *Virology* (1973) 52, 456-467), método de DEAE-dextrano, y similares.

En la siguiente etapa de producción de anticuerpos, se recogen los productos de expresión obtenidos en la etapa (a). Los productos de expresión se pueden recoger, por ejemplo, cultivando los transformantes y después separando los productos de las células transformadas o medio de cultivo. La separación y purificación de anticuerpos se puede lograr por una combinación adecuada de métodos tales como centrifugación, fraccionamiento con sulfato amónico, precipitación salina, ultrafiltración, columnas de 1q, FcRn, proteína A y proteína G, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de filtración en gel.

Métodos para mejorar la estabilidad de la región constante de IgG2 en condiciones ácidas

La descripción también se refiere a métodos para mejorar la estabilidad del anticuerpo en condiciones ácidas, que comprende la etapa de sustituir la Met en la posición 276 (posición 397 en el sistema de numeración EU) en la
55 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (IgG2) por otro aminoácido. Los métodos descritos en la presente memoria para mejorar la estabilidad del anticuerpo en condiciones ácidas pueden comprender otras etapas de

sustitución de aminoácidos, con la condición de que comprendan la etapa de sustitución de la Met en la posición 276 (posición 397 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (IgG2) por otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución por Val. El método para la sustitución del aminoácido no está particularmente limitado. La sustitución se puede lograr, por ejemplo, por mutagénesis dirigida descrita antes o un método descrito en los ejemplos.

Métodos para reducir la heterogeneidad originada en la región bisagra de la región constante de IgG2

La descripción también se refiere a métodos para reducir la heterogeneidad del anticuerpo, que comprenden la etapa de sustituir la Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), y/o Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (IgG2) por otros aminoácidos. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren las sustituciones de Cys por Ser en la posición 14, Arg por Lys en la posición 16, y Cys por Ser en la posición 102. Los métodos descritos en la presente memoria para reducir la heterogeneidad del anticuerpo pueden comprender otras etapas de sustitución de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa de sustituir la Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), y/o Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (IgG2). El método para la sustitución de aminoácido no está particularmente limitado. Las sustituciones se pueden lograr, por ejemplo, por mutagénesis dirigida descrita antes o un método descrito en los ejemplos. En la sustitución del aminoácido, se pueden sustituir los tres aminoácidos descritos antes o se pueden sustituir uno o dos de ellos (por ejemplo, posiciones 14 y 102).

Métodos para reducir la heterogeneidad originada en la eliminación de los aminoácidos C-terminales en una región constante de IgG2

La descripción también se refiere a métodos para reducir la heterogeneidad del anticuerpo, que comprenden la etapa de eliminación de la Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración EU) y la Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración EU) en una región constante de la IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Los métodos descritos en la presente memoria para reducir la heterogeneidad del anticuerpo pueden comprender otras etapas de sustitución de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa de eliminar la Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración EU) y la Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración EU) en una región constante de la IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. El método para la sustitución del aminoácido no está particularmente limitado. La sustitución se puede lograr, por ejemplo, por mutagénesis dirigida descrita antes o un método descrito en los ejemplos.

Métodos para mejorar la farmacocinética por sustitución de aminoácidos de la región constante de IgG2

La descripción también se refiere a métodos para mejorar la farmacocinética de un anticuerpo, que comprenden la etapa de sustituir la His en la posición 14 (EU268), Arg en la posición 234 (EU355), y/o Gln en la posición 298 (EU419) en una región constante de la IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Los métodos descritos en la presente memoria para mejorar la farmacocinética de un anticuerpo pueden comprender otras etapas de sustitución de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa descrita antes. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren las sustituciones de His por Gln en la posición 147 (EU268), Arg por Gln en la posición 234 (EU355), y Gln por Glu en la posición 298 (EU419).

La descripción también se refiere a métodos para mejorar la farmacocinética de un anticuerpo, que comprenden la etapa de sustituir la Asn en la posición 313 (EU434) en una región constante de la IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 35 (M58). El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución por Ala. Los métodos descritos en la presente memoria para mejorar la farmacocinética de un anticuerpo pueden comprender otras sustituciones de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa descrita antes.

Métodos para mejorar la farmacocinética sustituyendo los aminoácidos de la región constante de IgG1

La descripción también se refiere a métodos para mejorar la farmacocinética de un anticuerpo, que comprenden la etapa de sustituir la Asn en la posición 317 (EU434) en una región constante de IgG1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución por Ala. Los métodos descritos en la presente memoria para mejorar la farmacocinética de un anticuerpo pueden comprender otras etapas de sustitución de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa descrita antes.

La descripción también se refiere a métodos para mejorar la farmacocinética de un anticuerpo y reducir la heterogeneidad originada en la eliminación de aminoácidos C-terminales, que comprenden la etapa de sustituir la Asn en la posición 317 (EU434) y eliminar la Gly en la posición 329 (EU446) y la Lys en la posición 330 (EU447) en una región constante de la IgG1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. El tipo de

aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución por Ala. Los métodos descritos en la presente memoria para mejorar la farmacocinética de un anticuerpo pueden comprender otras etapas de sustitución de aminoácidos siempre que comprendan la etapa descrita antes.

Métodos para reducir la unión al FcγR mientras se mantiene la secuencia humana en la región constante de la IgG2

- 5 La descripción también se refiere a métodos para reducir la unión al FcγR de un anticuerpo, que comprenden la etapa de sustituir la Ala por Ser en la posición 209 (EU330), Pro por Ser en la posición 210 (EU331), y Thr por Ala en la posición 218 (EU339) en una región constante de la IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Los métodos descritos en la presente memoria para reducir la unión a FcγR de un anticuerpo, pueden comprender otras etapas de sustituciones de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa de sustitución
- 10 de Ala por Ser en la posición 209 (EU330), Pro por Ser en la posición 210 (EU331), y Thr por Ala en la posición 218 (EU339) en una región constante de la IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. El método para la sustitución del aminoácido no está particularmente limitado. La sustitución se puede lograr, por ejemplo, por mutagénesis dirigida descrita antes o un método descrito en los ejemplos.

- 15 La descripción también se refiere a métodos para reducir la heterogeneidad originada en la región bisagra de la IgG2, métodos para mejorar la estabilidad del anticuerpo en condiciones ácidas, métodos para reducir la heterogeneidad del anticuerpo originada en el extremo C, y/o métodos para reducir la unión al FcγR de un anticuerpo, todos los cuales comprenden, en una región constante de IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (M14ΔGK), las etapas de:

- 20 (a) sustituir la Ala en la posición 209 (posición 330 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;
- (b) sustituir la Pro en la posición 210 (posición 331 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;
- (c) sustituir la Thr en la posición 218 (posición 339 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;
- 25 (d) sustituir la Met en la posición 276 (posición 397 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;
- (e) sustituir la Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;
- 30 (f) sustituir la Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;
- (g) sustituir la Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;
- (h) sustituir la Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;
- 35 (i) sustituir la Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido; y
- (j) eliminar la Gly en la posición 325 y la Lys en la posición 326 (posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración EU, respectivamente) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

- 40 El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren las sustituciones de Ala por Ser en la posición 209 (posición 330 en el sistema de numeración EU), Pro por Ser en la posición 210 (posición 331 en el sistema de numeración EU), Thr por Ala en la posición 218 (posición 339 en el sistema de numeración EU), Met por Val en la posición 276 (posición 397 en el sistema de numeración EU), Cys por Ser en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg por Lys en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), Cys por Ser en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), Glu por Gly en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), y Ser por Gly en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU).

- La descripción también se refiere a métodos para reducir la heterogeneidad originada en la región bisagra de la IgG2, métodos para reducir la heterogeneidad del anticuerpo originada en el extremo C y/o métodos para reducir la unión al FcγR de un anticuerpo, todos los cuales comprenden, en una región constante de IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (M86ΔGK), las etapas de:
- 50

(a) sustituir la Ala en la posición 209 (posición 330 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;

(b) sustituir la Pro en la posición 210 (posición 331 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;

(c) sustituir la Thr en la posición 218 (posición 339 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;

5 (d) sustituir la Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;

(e) sustituir la Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;

10 (f) sustituir la Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;

(g) sustituir la Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;

(h) sustituir la Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido; y

15 (i) eliminar la Gly en la posición 325 y la Lys en la posición 326 (posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración EU, respectivamente) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren las sustituciones de Ala por Ser en la posición 209 (posición 330 en el sistema de numeración EU), Pro por Ser en la posición 210 (posición 331 en el sistema de numeración EU), Thr por Ala en la posición 218 (posición 339 en el sistema de numeración EU), Cys por Ser en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg por Lys en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), Cys por Ser en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), Glu por Gly en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), y Ser por Gly en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU).

25 Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender otras etapas tales como sustitución y eliminación de aminoácidos, siempre que comprendan las etapas descritas antes. Los métodos para la sustitución y eliminación de aminoácidos no están particularmente limitados. La sustitución y eliminación se pueden lograr, por ejemplo, por mutagénesis dirigida descrita antes o un método descrito en los ejemplos.

30 La descripción también se refiere a métodos para reducir la heterogeneidad originada en la región bisagra de la IgG2, métodos para mejorar la estabilidad del anticuerpo en condiciones ácidas y/o métodos para reducir la heterogeneidad del anticuerpo originada en el extremo C, todos los cuales comprenden, en un región constante de IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (M31ΔGK), las etapas de:

(a) sustituir la Met en la posición 276 (posición 397 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;

35 (b) sustituir la Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;

(c) sustituir la Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;

(d) sustituir la Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;

40 (e) sustituir la Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;

(f) sustituir la Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido; y

45 (g) eliminar la Gly en la posición 325 y la Lys en la posición 326 (posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración EU, respectivamente) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren las sustituciones de Met por Val en la posición 276 (posición 397 en el sistema de numeración EU), Cys por Ser en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg por Lys en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), Cys por Ser en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), Glu por Gly en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), y Ser por Gly en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU).

50

La descripción también se refiere a métodos para reducir la heterogeneidad originada en la región bisagra de la IgG2 y/o métodos para reducir la heterogeneidad del anticuerpo originada en el extremo C, todos los cuales comprenden, en un región constante de IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (M40ΔGK), las etapas de:

- 5 (a) sustituir la Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;
- (b) sustituir la Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;
- 10 (c) sustituir la Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;
- (d) sustituir la Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido;
- (e) sustituir la Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 por otro aminoácido; y
- 15 (f) eliminar la Gly en la posición 325 y la Lys en la posición 326 (posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración EU, respectivamente) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren las sustituciones de Cys por Ser en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg por Lys en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), Cys por Ser en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), Glu por Gly en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), y Ser por Gly en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU).

La descripción también se refiere a métodos para reducir la heterogeneidad del anticuerpo originada en la región bisagra de la IgG2, métodos para mejorar la farmacocinética y/o métodos para reducir la heterogeneidad del anticuerpo originada en el extremo C, todos los cuales comprenden, en un región constante de IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (M58), las etapas de:

- (a) sustituir la Cys por Ser en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
- (b) sustituir la Arg por Lys en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
- 30 (c) sustituir la Cys por Ser en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
- (d) sustituir la Glu por Gly en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
- 35 (e) sustituir la Ser por Gly en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
- (f) sustituir la His por Gln en la posición 147 (posición 268 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
- (g) sustituir la Arg por Gln en la posición 234 (posición 355 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
- 40 (h) sustituir la Gln para Glu en la posición 298 (posición 419 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y
- (i) eliminar la Gly en la posición 325 y la Lys en la posición 326 (posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración EU, respectivamente) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

La descripción también se refiere a métodos para reducir la heterogeneidad del anticuerpo originada en la región bisagra de la IgG2, métodos para mejorar la farmacocinética y/o métodos para reducir la heterogeneidad del anticuerpo originada en el extremo C, todos los cuales comprenden, en un región constante de IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (M73), las etapas de:

- (a) sustituir la Cys por Ser en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;
- 50 (b) sustituir la Arg por Lys en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

(c) sustituir la Cys por Ser en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

5 (d) sustituir la Glu por Gly en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

(e) sustituir la Ser por Gly en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

(f) sustituir la His por Gln en la posición 147 (posición 268 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

10 (g) sustituir la Arg por Gln en la posición 234 (posición 355 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

(h) sustituir la Gln por Glu en la posición 298 (posición 419 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2;

15 (i) sustituir la Asn por Ala en la posición 313 (posición 434 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y

(i) eliminar la Gly en la posición 325 y la Lys en la posición 326 (posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración EU, respectivamente) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

20 Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender otras etapas tales como sustitución y eliminación de aminoácidos, siempre que comprendan las etapas descritas antes. Los métodos para la sustitución y eliminación de aminoácidos no están particularmente limitados. La sustitución y eliminación se pueden lograr, por ejemplo, por mutagénesis dirigida descrita antes o un método descrito en los ejemplos.

Métodos para mejorar la estabilidad de una región constante de IgG4 en condiciones ácida

25 La descripción también se refiere a métodos para mejorar la estabilidad del anticuerpo en condiciones ácidas, que comprenden la etapa de sustituir la Arg en la posición 289 (posición 409 en el sistema de numeración EU) de una región constante de la IgG4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 por otro aminoácido. Los métodos descritos en la presente memoria para mejorar la estabilidad del anticuerpo en condiciones ácidas pueden comprender otras etapas de sustitución de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa de sustituir la Arg en la posición 289 (posición 409 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (región constante de la IgG4 humana) por otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución por Lys. El método para la sustitución del aminoácido no está particularmente limitado. La sustitución se puede lograr, por ejemplo, por mutagénesis dirigida descrita antes o un método descrito en los ejemplos.

Métodos para reducir la heterogeneidad originada en la eliminación de aminoácidos C-terminales en una región constante de IgG4

35 La descripción también se refiere a métodos para reducir la heterogeneidad de un anticuerpo, que comprenden la etapa de eliminar la Gly en la posición 326 (posición 446 en el sistema de numeración EU) y la Lys en la posición 327 (posición 447 en el sistema de numeración EU) en una región constante de la IgG4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (*Mol. Immunol.*, enero de 1993; 30(1):105-8). Los métodos descritos en la presente memoria para reducir la heterogeneidad pueden comprender otras etapas de sustitución de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa de eliminar la Lys en la posición 327 (posición 447 en el sistema de numeración EU) y/o la Gly en la posición 326 (posición 446 en el sistema de numeración EU) en una región constante de IgG4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. El método para la sustitución del aminoácido no está particularmente limitado. La sustitución se puede lograr, por ejemplo, por mutagénesis dirigida descrita antes o un método descrito en los ejemplos.

45 La descripción también se refiere a métodos para mejorar la estabilidad en condiciones ácidas, métodos para reducir la heterogeneidad originada en el extremo C y/o métodos para reducir la unión al FcγR de un anticuerpo, todos los cuales comprenden, en una región constante de IgG4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (M11ΔGK), las etapas de:

50 (a) sustituir la Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 por otro aminoácido;

(b) sustituir la Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 por otro aminoácido;

- (c) sustituir la Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 por otro aminoácido;
- (d) sustituir la Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 por otro aminoácido;
- 5 (e) sustituir la Arg en la posición 97 (posición 214 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 por otro aminoácido;
- (f) sustituir la Ser en la posición 100 (posición 217 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 por otro aminoácido;
- 10 (g) sustituir la Tyr en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 por otro aminoácido;
- (h) sustituir la Gly en la posición 103 (posición 220 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 por otro aminoácido;
- (i) sustituir la Pro en la posición 104 (posición 221 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 por otro aminoácido;
- 15 (j) sustituir la Pro en la posición 105 (posición 222 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 por otro aminoácido;
- (k) sustituir la Glu en la posición 113 (posición 233 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 por otro aminoácido;
- 20 (l) sustituir la Phe en la posición 114 (posición 234 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 por otro aminoácido;
- (m) sustituir la Leu en la posición 115 (posición 235 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 por otro aminoácido;
- (n) eliminar la Gly en la posición 116 (posición 236 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
- 25 (o) sustituir la Arg en la posición 289 (posición 409 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 por otro aminoácido; y
- (p) eliminar la Gly en la posición 236 y la Lys en la posición 237 (posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración EU, respectivamente) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
- 30 El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren las sustituciones de Cys por Ser en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg por Lys en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), Glu por Gly en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), Ser por Gly en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU), Arg por Thr en la posición 97 (posición 214 en el sistema de numeración EU), Ser por Arg en la posición 100 (posición 217 en el sistema de numeración EU), Tyr por Ser en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU),
- 35 Gly por Cys en la posición 103 (posición 220 en el sistema de numeración EU), Pro por Val en la posición 104 (posición 221 en el sistema de numeración EU), Pro por Glu en la posición 105 (posición 222 en el sistema de numeración EU), Glu por Pro en la posición 113 (posición 233 en el sistema de numeración EU), Phe por Val en la posición 114 (posición 234 en el sistema de numeración EU), Leu por Ala en la posición 115 (posición 235 en el sistema de numeración EU), y Arg por Lys en la posición 289 (posición 409 en el sistema de numeración EU).
- 40 Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender otras etapas tales como sustitución y eliminación de aminoácidos, siempre que comprendan las etapas descritas antes. Los métodos para la sustitución y eliminación de aminoácidos no están particularmente limitados. La sustitución y eliminación se pueden lograr, por ejemplo, por mutagénesis dirigida descrita antes o un método descrito en los ejemplos.
- 45 Métodos para reducir la heterogeneidad originada en la eliminación de aminoácidos C-terminales en una región constante de IgG1
- La descripción también se refiere a métodos para reducir la heterogeneidad del anticuerpo, que comprenden la etapa de eliminar la Gly en la posición 329 (posición 446 en el sistema de numeración EU) y la Lys en la posición 330 (posición 447 en el sistema de numeración EU) en una región constante de IgG1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Los métodos descritos en la presente memoria para reducir la heterogeneidad del anticuerpo pueden comprender otras etapas de sustituciones de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa de eliminar la Lys en la posición 330 (posición 447 en el sistema de numeración EU) y la Gly en la posición 329 (posición 446 en el sistema de numeración EU) en una región constante de la IgG1 que comprende la secuencia de
- 50

aminoácidos de SEQ ID NO: 1. El método para la sustitución del aminoácido no está particularmente limitado. La sustitución se puede lograr, por ejemplo, por mutagénesis dirigida descrita antes o un método descrito en los ejemplos.

5 Las regiones constantes de anticuerpos descritas antes no están particularmente limitadas y se pueden usar para cualesquiera anticuerpos. Los ejemplos de anticuerpos que usan la región constante descrita en la presente memoria, incluyen:

(a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48 (VH4-M73);

(b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46 (VH3-M73);

(c) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44 (VH5-M83);

10 (d) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 49 (VL1-kappa);

(e) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47 (VL3-kappa);

(f) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 (VL5-kappa);

(g) un anticuerpo que comprende la cadena pesada de (a) y la cadena ligera de (d) (FV3-M73);

(h) un anticuerpo que comprende la cadena pesada de (b) y la cadena ligera de (e) (FV4-M73); y

15 (i) un anticuerpo que comprende la cadena pesada de (c) y la cadena ligera de (f) (FV5-M83).

Composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos

La descripción se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo descrito en la presente memoria.

20 Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se puede formular, además de con los anticuerpos, con vehículos farmacéuticamente aceptables por métodos conocidos. Por ejemplo, las composiciones se pueden usar por vía parenteral, cuando los anticuerpos se formulan en una solución o suspensión estéril para inyección usando agua o cualquier otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las composiciones se pueden formular combinando adecuadamente los anticuerpos con vehículos o medios farmacéuticamente aceptables, específicamente, agua estéril o solución salina fisiológica, aceites vegetales, emulsionantes, agentes de suspensión, tensioactivos, estabilizantes, agentes aromatizantes, excipientes, vehículos, conservantes, agentes aglutinantes, y similares, mezclándolos en una dosis y forma unitaria necesaria para las implementaciones farmacéuticas aceptadas en general. El contenido del principio activo en dicha formulación se ajusta de modo que se pueda obtener una dosis adecuada dentro del intervalo requerido.

25 Las composiciones estériles para inyección se pueden formular usando vehículos tales como agua destilada para inyección, de acuerdo con protocolos convencionales.

30 Las soluciones acuosas usadas para inyección incluyen, por ejemplo, solución salina fisiológica y soluciones isotónicas que contienen glucosa u otros adyuvantes tales como D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro sódico. Estos se pueden usar junto con solubilizantes adecuados tales como alcohol, específicamente etanol, polialcoholes tales como propilenglicol y polietilenglicol, y tensioactivos no iónicos tales como polisorbato 80TM y HCO-50.

35 Los aceites incluyen aceites de sésamo y aceites de soja, y se pueden combinar con solubilizantes tales como benzoato de bencilo o alcohol bencílico. Estos se pueden formular con tampones, por ejemplo, tampones de fosfato o tampones de acetato sódico; analgésicos, por ejemplo, hidrocloreto de procaína; estabilizantes, por ejemplo alcohol bencílico o fenol; o antioxidantes. Las inyecciones preparadas típicamente se dividen en partes alícuotas en ampollas adecuadas.

40 La administración se lleva a cabo preferiblemente por vía parenteral y específicamente incluye la administración intranasal, administración intrapulmonar y administración percutánea. Por ejemplo, las inyecciones se pueden administrar por vía sistémica o local por inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal o inyección subcutánea.

45 Además, el método de administración se puede seleccionar adecuadamente de acuerdo con la edad y síntomas del paciente. Se puede seleccionar una dosis única de la composición farmacéutica que contiene un anticuerpo o un polinucleótido que codifica un anticuerpo, por ejemplo, del intervalo de 0,0001 a 1.000 mg por kg de peso corporal. Alternativamente, la dosis puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,001 a 100.000 mg/persona. Sin embargo, la dosis no está limitada a estos valores. La dosis y el método de administración varían dependiendo del peso corporal, edad y síntomas del paciente, y los pueden seleccionar adecuadamente los expertos en la técnica.

50 Como se usa en la presente memoria, los códigos de tres letras y de una letra para los respectivos aminoácidos son

los siguientes:

Alanina: Ala (A)

Arginina: Arg (R)

Asparagina: Asn (N)

5 Ácido aspártico: Asp (D)

Cisteína: Cys (C)

Glutamina: Gln (Q)

Ácido glutámico: Glu (E)

Glicina: Gly (G)

10 Histidina: His (H)

Isoleucina: Ile (I)

Leucina: Leu (L)

Lisina: Lys (K)

Metionina: Met (M)

15 Fenilalanina: Phe (F)

Prolina: Pro (P)

Serina: Ser (S)

Treonina: Thr (T)

Triptófano: Trp (W)

20 Tirosina: Tyr (Y)

Valina: Val (V)

Ejemplos

En lo sucesivo, la invención se describe más específicamente con referencia a los ejemplos.

Ejemplo 1. Mejora de la estabilidad de la IgG2 e IgG4 en condiciones ácidas

25 Construcción de vectores de expresión para anticuerpos contra el receptor de IL-6 humanizados convertidos con IgG2 o IgG4 y expresión de los anticuerpos.

Para reducir la afinidad de unión al receptor Fcγ, la región constante de un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano, anticuerpo para PM-1 humanizado (*Cancer Res.* Feb 1993 15; 53(4):851-6), que es del isotipo IgG1, se sustituyó por IgG2 o IgG4 (*Mol. Immunol.*, enero 1993;30(1): 105-8) para generar moléculas WT-IgG2 (SEQ ID NO: 13) y WT-IgG4 (SEQ ID NO: 14). Se usó un vector de expresión en célula animal para expresar las IgG. Se construyó un vector de expresión, en el que la región constante del anticuerpo PM-1 humanizado (IgG1) usado en el ejemplo de referencia 1, se digirió con *NheI/NotI* y después se sustituyó por la región constante de la IgG2 o IgG4 por ligado. La secuencia de nucleótidos de cada fragmento de ADN se determinó con un secuenciador de ADN (ABI PRISM 3730xL DNA Sequencer o ABI PRISM 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystems)) usando el kit de secuenciación BigDye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems) de acuerdo con el manual de instrucciones. Usando la cadena L WT (por sus siglas en inglés *wild type*, tipo natural) (SEQ ID NO: 15), se expresaron WT-IgG1, WT-IgG2, y WT-IgG4 por el método descrito a continuación. Se suspendieron células HEK293H derivadas de cáncer de riñón embrionario humano (Invitrogen) en medio DMEM complementado con suero bovino fetal al 10% (Invitrogen). Las células se sembraron en placas (10 ml/placa; densidad celular de 5 a 6 x 10⁵ células/ml) para células adherentes (10 cm de diámetro, CORNING) y se cultivaron en un incubador con CO₂ (37°C, 5% de CO₂) durante un día y una noche enteros. Después, se separó el medio por aspiración, y se añadieron 6,9 ml de medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen). La mezcla de ADN plasmídico preparada (13,8 µg en total) se combinó con 20,7 µl de polietilenimina 1 µg/ml (Polysciences Inc.) y 690 µl de CHO-S-SFMII. La mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante 10 min, y después se añadió a las células en cada placa. Las células se incubaron en un incubador con CO₂ (37°C con 5% de CO₂) durante 4 a 5 horas. Después se añadieron 6,9 ml de medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen) a las placas, y

las células se incubaron en un incubador con CO₂ durante 3 días. Se recogieron los líquidos sobrenadantes y se centrifugaron (aproximadamente 2000 g, 5 min, temperatura ambiente) para separar las células, y se esterilizaron a través de un filtro de 0,22 µm MILLEX^(R)-GV (Millipore). Las muestras se almacenaron a 4°C hasta su uso.

(1) anticuerpo PM-1 humanizado cadena H (PM-1 VH + IgG1), SEQ ID NO: 12 (secuencia de aminoácidos)

5 (2) PM-1 humanizado cadena H PM-1 VH + IgG2, SEQ ID NO: 13 (secuencia de aminoácidos)

(3) PM-1 humanizado cadena H PM-1 VH + IgG4, SEQ ID NO: 14 (secuencia de aminoácidos)

Purificación de WT-IgG1, WT-IgG2 y WT-IgG4 por elución en proteína A usando ácido clorhídrico

Se añadieron 50 µl de rProtein A SepharoseTM Fast Flow (Amersham Biosciences) suspendidos en TBS a los líquidos sobrenadantes de cultivo obtenidos, y las disoluciones combinadas se mezclaron por inversión a 4°C durante 4 horas o más. Las disoluciones se transfirieron a copas de filtro de 0,22 µm de Ultrafree[®]-MC (Millipore). Después de lavar 3 veces con 500 µl de TBS, las resinas rProtein A SepharoseTM se suspendieron en 100 µl de HCl 10 mM/NaCl 150 mM (pH 2,0) y las mezclas se incubaron durante 2 minutos para eluir los anticuerpos (elución con ácido clorhídrico). Inmediatamente, los eluatos se neutralizaron añadiendo 6,7 µl de Tris-HCl 1,5 M (pH 7,8). La elución se llevó a cabo dos veces, dando 200 µl de anticuerpos purificados.

15 Análisis por cromatografía de filtración en gel de WT-IgG1, WT-IgG2 y WT-IgG4 purificados por elución con ácido clorhídrico

El contenido de agregados en las muestras purificadas obtenidas por la elución con ácido clorhídrico, se evaluó por análisis de cromatografía de filtración en gel.

Método de evaluación de la agregación:

20 Sistema: Waters Alliance

Columna: G3000SWxl (TOSOH)

Fase móvil: fosfato sódico 50 mM, KCl 300 mM, pH 7,0

Caudal, longitud de onda: 0,5 ml/min, 220 nm

25 El resultado se muestra en la figura 1. Aunque el contenido de agregados en WT-IgG1 después de purificación era aproximadamente 2%, los de WT-IgG2 y WT-IgG4 después de purificación eran aproximadamente 25%. Esto sugiere que la IgG1 es estable al ácido durante la elución con ácido clorhídrico, y en cambio, la IgG2 e IgG4 son inestables y sufren desnaturalización/agregación. Por lo tanto, la estabilidad de la IgG2 y la IgG4 en condiciones ácidas se demostró que era menor que la de la IgG1. La proteína A se ha usado con frecuencia para purificar moléculas de IgG, y las moléculas de IgG eluyen de la proteína A en condiciones ácidas. Además la inactivación de virus, que es necesaria cuando se desarrollan moléculas de IgG como productos farmacéuticos, en general se lleva a cabo en condiciones ácidas. Por lo tanto, es conveniente que la estabilidad de las moléculas de IgG en condiciones ácidas sea mayor. Sin embargo, se encontró que la estabilidad de las moléculas de IgG2 e IgG4 en condiciones ácidas era menor que la de la IgG1, y sugiere por primera vez que hay un problema de desnaturalización/agregación en condiciones ácidas en el desarrollo de moléculas de IgG2 e IgG4 como productos farmacéuticos. Es conveniente superar este problema de desnaturalización/agregación cuando se desarrollan como productos farmacéuticos. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha publicado ningún método para resolver este problema por sustitución de aminoácidos.

Preparación y evaluación de WT-IgG2 y WT-IgG4 que tienen un dominio CH3 alterado

40 La estabilidad de las moléculas de IgG2 e IgG4 en condiciones ácidas se demostró que era menor que la de la IgG1. Por lo tanto, se ensayaron formas alteradas de moléculas de IgG2 e IgG4 para mejorar la estabilidad en condiciones ácidas. De acuerdo con modelos de las regiones constantes de las moléculas de IgG2 e IgG4, uno de los potenciales factores desestabilizantes en condiciones ácidas se cree que era la inestabilidad en la interfase del dominio CH3-CH3. Se pensó que la metionina en la posición 397 en el sistema de numeración EU en la IgG2, o arginina en la posición 409 en el sistema de numeración EU en la IgG4, desestabilizaban la interfase CH3/CH3. 45 Puesto que las posiciones 397 y 409 de la IgG1 en el sistema de numeración EU son valina y lisina, respectivamente, se preparó un anticuerpo IgG2 alterado que comprende la sustitución de la metionina por valina en la posición 397 en el sistema de numeración EU (IgG2-M397V, SEQ ID NO: 16 (secuencia de aminoácidos)) y un anticuerpo IgG4 alterado que comprende la sustitución de arginina por lisina en la posición 409 en el sistema de numeración EU (IgG4-R409K, SEQ ID NO: 17 (secuencia de aminoácidos)).

50 Los métodos usados para construir vectores de expresión para los anticuerpos de interés, y expresión y purificación de los anticuerpos, eran los mismos que los usados para la elución con ácido clorhídrico descrita antes. El análisis de cromatografía por filtración en gel se llevó a cabo para calcular el contenido de agregados en las muestras purificadas obtenidas por elución con ácido clorhídrico de la proteína A.

Método de evaluación de la agregación:

Sistema: Waters Alliance

Columna: G3000SWxl (TOSOH)

Fase móvil: fosfato sódico 50 mM, KCl 300 mM, pH 7,0

5 Caudal, longitud de onda: 0,5 ml/min, 220 nm

El resultado se muestra en la figura 1. Aunque el contenido de agregados en WT-IgG1 después de purificación era aproximadamente 2%, los de WT-IgG2 y WT-IgG4 después de purificación eran aproximadamente 25%. En cambio, el contenido de agregados en variantes con el dominio CH3 alterado, IgG2-M397V y IgG4-R409K, era comparable (aproximadamente 2%) al de la IgG1. Este descubrimiento demuestra que la estabilidad de un anticuerpo IgG2 o IgG4 en condiciones ácidas se puede mejorar sustituyendo la metionina por valina de la IgG2 en la posición 397 en el sistema de numeración EU o la arginina por lisina de la IgG4 en la posición 409 en el sistema de numeración EU, respectivamente. Los anticuerpos purificados se dializaron contra una disolución de acetato sódico 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0 (EasySEP, TOMY). La medición por DSC (mediciones de temperatura en el punto medio y valor de T_m) se llevó a cabo a una velocidad de calentamiento de 1°C/min de 40 a 100°C con una concentración de proteína de aproximadamente 0,1 mg/ml. Además, se determinaron las temperaturas del punto medio de la desnaturalización térmica de WT-IgG2, WT-IgG4, IgG2-M397V y IgG4-R409K. El resultado mostró que el valor de T_m para el dominio CH3 alterado era mayor en IgG2-M397V y IgG4-R409K comparado con WT-IgG2 y WT-IgG4, respectivamente. Esto sugiere que IgG2-M397V y IgG4-R409K también son superiores en términos de estabilidad térmica comparados con WT-IgG2 y WT-IgG4, respectivamente.

20 La IgG2 e IgG4 se exponen a condiciones ácidas en el procedimiento de inactivación de virus y en el procedimiento de purificación usando proteína A. Por lo tanto, la desnaturalización/agregación en los procedimientos anteriores era problemática. Sin embargo, se descubrió que el problema se podía resolver usando IgG2-M397V y IgG4-R409K para las secuencias de las regiones constantes de la IgG2 e IgG4. Además, la utilidad de IgG2-M397V y IgG4-R409K también se demostró por el descubrimiento de que eran superiores en estabilidad térmica.

25 Ejemplo 2. Mejora de la heterogeneidad derivada de los enlaces disulfuro en la IgG2

Purificación de WT-IgG1, WT-IgG2 y WT-IgG4 por elución con ácido acético de la proteína A

Se añadieron 50 µl de rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) suspendidos en TBS a los líquidos sobrenadantes de cultivo obtenidos en el ejemplo 1, y las disoluciones combinadas se mezclaron por inversión a 4°C durante 4 horas o más. Las disoluciones se transfirieron a copas de filtro de 0,22 µm de Ultrafree®-MC (Millipore). Después de lavar 3 veces con 500 µl de TBS, las resinas rProtein A Sepharose™ se suspendieron en 100 µl de disolución acuosa de acetato sódico 50 mM (pH 3,3) y las mezclas se incubaron durante 2 minutos para eluir los anticuerpos. Inmediatamente, los eluatos se neutralizaron añadiendo 6,7 µl de Tris-HCl 1,5 M (pH 7,8). La elución se llevó a cabo dos veces, dando 200 µl de anticuerpos purificados.

Análisis por cromatografía de intercambio catiónico (IEC) de WT-IgG1, WT-IgG2 y WT-IgG4

35 Se analizó la homogeneidad de las WT-IgG1, WT-IgG2 y WT-IgG4 purificadas por cromatografía de intercambio catiónico.

Método de evaluación usando IEC:

Sistema: Waters Alliance

Columna: ProPac WCX-10 (Dionex)

40 Fase móvil A: MES-NaOH 25 mM, pH 6,1

B: MES-NaOH 25 mM, acetato Na 250 mM, pH 6,1

Caudal, longitud de onda: 0,5 ml/min, 280 nm

Gradiente de B: 50%-75% (75 min) en el análisis de WT-IgG1

B: 30%-55% (75 min) en el análisis de WT-IgG2 y WT-IgG4

45 El resultado se muestra en la figura 2. La WT-IgG2 mostró más de un pico en el análisis de intercambio catiónico mientras que la WT-IgG1 y WT-IgG4 presentaron un solo pico. Esto sugiere que la molécula de IgG2 es más heterogénea comparada con la IgG2 e IgG4. Realmente, se ha descrito que los isotipos de IgG2 tienen heterogeneidad derivada de enlaces disulfuro en la región bisagra (documento de no patente 10). Por lo tanto, los picos heterogéneos de la IgG2 mostrados en la figura 2 también se supone que son sustancia objetivo/sustancias relacionadas derivadas de los enlaces disulfuro. No es fácil fabricarlas como productos farmacéuticos a gran escala

mientras se mantiene la heterogeneidad relacionada con sustancia objetivo/sustancias relacionadas entre producciones. Por lo tanto, son deseables sustancias homogéneas (menos heterogéneas) tanto como sea posible, para las moléculas de anticuerpos desarrolladas como productos farmacéuticos. Para la IgG2 de tipo natural hay un problema de homogeneidad que es importante en el desarrollo de productos farmacéuticos de anticuerpos. Realmente, el documento USA20060194280 (A1) ha mostrado que la IgG2 natural da diferentes picos heterogéneos como resultado de los enlaces disulfuro en el análisis de cromatografía de intercambio iónico, y que la actividad biológica varía entre estos picos. El documento USA20060194280 (A1) describe el replegado en el procedimiento de purificación como un método para combinar los picos heterogéneos en uno solo, pero el uso de dicho procedimiento en la producción es costoso y complicado. Por lo tanto, un método preferido para combinar los picos heterogéneos en uno solo se basa en las sustituciones de aminoácidos. Aunque la heterogeneidad originada en los enlaces disulfuro en la región bisagra debe superarse para desarrollar la IgG2 como productos farmacéuticos, no se ha publicado hasta la fecha ningún método para resolver este problema por la sustitución de aminoácidos.

Preparación y evaluación del dominio CH1 de WT-IgG2 y región bisagra

Como se muestra en la figura 3, hay diferentes patrones de enlaces disulfuro potenciales para una molécula de IgG2. Las posibles causas de la heterogeneidad derivada de la región bisagra de la IgG2 eran los diferentes patrones de enlaces disulfuro y cisteínas libres. La IgG2 tiene dos cisteínas (en las posiciones 219 y 220 en el sistema de numeración EU) en la región bisagra superior, y las cisteínas adyacentes a las dos cisteínas de la región bisagra superior incluyen la cisteína en la posición 131 en el sistema de numeración EU en el dominio CH1 de la cadena H y la cisteína C-terminal de la cadena L, y dos cisteínas correspondientes en la región bisagra superior de la cadena H del patrón de dimerización. Específicamente, hay 8 cisteínas en total en la proximidad de la región bisagra superior de la IgG2 cuando el anticuerpo está en la forma asociada de H2L2. Esta puede ser la razón de los diferentes patrones heterogéneos debidos a enlaces disulfuro y cisteínas libres erróneos.

La secuencia de la región bisagra del dominio CH1 de la IgG2 se alteró para reducir la heterogeneidad originada en la región bisagra de la IgG2. Se llevaron a cabo exámenes para evitar la heterogeneidad de la IgG2 debida al patrón diferencial de los enlaces disulfuro y cisteínas libres. El resultado de examinar diferentes anticuerpos alterados sugería que la heterogeneidad podría evitarse sin disminuir la estabilidad térmica sustituyendo la cisteína y la arginina por serina y lisina en las posiciones 131 y 133 en el sistema de numeración EU, respectivamente, en el dominio CH1 de la cadena H, y sustituyendo la cisteína por serina en la posición 219, numeración EU, en la región bisagra superior de la cadena H de la secuencia de la región constante de la IgG2 de tipo natural (en lo sucesivo IgG2-SKSC) (IgG2-SKSC, SEQ ID NO: 18). Estas sustituciones permitirían que IgG2-SKSC formara un enlace covalente homogéneo entre las cadenas H y L, que es un enlace disulfuro entre la cisteína C-terminal de la cadena L y la cisteína en la posición 220 en el sistema de numeración EU (Fig. 4).

Los métodos descritos en el ejemplo de referencia 1 se usaron para construir un vector de expresión para IgG2-SKSC y para expresar y purificar IgG2-SKSC. Se analizó la homogeneidad de la IgG2-SKSC purificada y la IgG2 de tipo natural (WT-IgG2) por cromatografía de intercambio catiónico.

Método de evaluación usando IEC:

Sistema: Waters Alliance

Columna: ProPac WCX-10 (Dionex)

Fase móvil A: MES-NaOH 25 mM, pH 5,6

B: MES-NaOH 25 mM, acetato Na 250 mM, pH 5,6

Caudal, longitud de onda: 0,5 ml/min, 280 nm

Gradiente B: 50%-100% (75 min)

El resultado se muestra en la figura 5. Como se esperaba antes, se mostró que la IgG2-SKSC era eluida con un solo pico, mientras que WT-IgG2 daba múltiples picos. Esto sugiere que la heterogeneidad derivada de enlaces disulfuro en la región bisagra de la IgG2 se puede evitar usando alteraciones tales como las usadas para generar IgG2-SKSC, lo que permite la formación de un solo enlace disulfuro entre la cisteína C-terminal de la cadena L y la cisteína en la posición 220 en el sistema de numeración EU. Las temperaturas del punto medio de la desnaturalización térmica de WT-IgG1, WT-IgG2 y IgG2-SKSC se determinaron por los mismos métodos descritos en el ejemplo 1. El resultado mostró que la WT-IgG2 daba un pico para el dominio Fab que tenía un valor de Tm menor que WT-IgG1, mientras que IgG2-SKSC no daba dicho pico. Esto sugiere que IgG2-SKSC también es superior en estabilidad térmica comparada con WT-IgG2.

Aunque se creía que la IgG2 de tipo natural tenía un problema de homogeneidad que es importante en el desarrollo de productos farmacéuticos de anticuerpos, se encontró que este problema se podía resolver usando IgG2-SKSC para la secuencia de la región constante de la IgG2. Por lo tanto, IgG2-SKSC es muy útil en el desarrollo de productos farmacéuticos de anticuerpos de IgG2. Además, la utilidad de la IgG2-SKSC también se demostró

encontrando que era superior en estabilidad térmica.

Ejemplo 3. Mejora de la heterogeneidad C-terminal en moléculas de IgG

Construcción de un vector de expresión para el anticuerpo de cadena H C-terminal Δ GK a partir de WT-IgG1

Para la heterogeneidad de las secuencias C-terminales de un anticuerpo, se ha descrito la eliminación del resto de aminoácido C-terminal lisina y la amidación del grupo amino C-terminal debido a la eliminación de ambos de los dos aminoácidos C-terminales, glicina y lisina (documento de no patente 12). Se prefiere la ausencia de dicha heterogeneidad cuando se desarrollan productos farmacéuticos de anticuerpos. De hecho, en el anticuerpo PM-1 humanizado TOCILIZUMAB, el componente principal de la secuencia que carece del aminoácido C-terminal lisina, que es codificado por la secuencia de nucleótidos pero eliminado en la modificación postranscripcional, y el componente minoritario que tiene la lisina, también coexisten como heterogeneidad. Específicamente, los autores de la presente invención alteraron la secuencia de nucleótidos de la IgG1 de tipo natural para eliminar la lisina y glicina C-terminales de la región constante de la cadena H de la IgG1, y evaluaron si la amidación del grupo amino C-terminal se podía suprimir eliminando los dos aminoácidos C-terminales glicina y lisina.

Se introdujeron mutaciones en la secuencia C-terminal de la cadena H usando el vector pB-CH que codifica el anticuerpo PM-1 humanizado (WT) obtenido en el ejemplo de referencia 1. La secuencia de nucleótidos que codifica la Lys en la posición 447 y/o la Gly en la posición 446 en el sistema de numeración EU, se convirtió en un codón de parada introduciendo una mutación usando el kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene), de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Por lo tanto, se construyeron los vectores de expresión para el anticuerpo diseñado para carecer del aminoácido C-terminal lisina (posición 447 en el sistema de numeración EU) y el anticuerpo diseñado para carecer de los dos aminoácidos C-terminales glicina y lisina (posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración EU, respectivamente). Los anticuerpos de cadena H C-terminal Δ K y Δ GK se obtuvieron expresando las cadenas H diseñadas y la cadena L del anticuerpo PM-1 humanizado. Los anticuerpos se expresaron y purificaron por el método descrito en el ejemplo de referencia 1.

El anticuerpo de cadena H C-terminal Δ GK purificado se analizó por cromatografía de intercambio catiónico de acuerdo con el siguiente procedimiento. El efecto de la eliminación C-terminal en la heterogeneidad se evaluó por análisis por cromatografía de intercambio catiónico usando el anticuerpo de cadena H C-terminal Δ GK purificado de acuerdo con el método descrito a continuación. Las condiciones del análisis por cromatografía de intercambio catiónico se describen a continuación. Se compararon los cromatogramas para el anticuerpo PM-1 humanizado, anticuerpo de cadena H C-terminal Δ K y anticuerpo de cadena H C-terminal Δ GK.

Columna: ProPac WCX-10 (Dionex)

Fase móvil A: MES/NaOH 25 mmol/l, pH 6,1

B: MES/NaOH 25 mmol/l, NaCl 250 mmol/l, pH 6,1

Caudal: 0,5 ml/min

Gradiente B: 25% de B (5 min) -> (105 min) -> 67% de B -> (1 min) -> 100% B (5 min)

Detección: 280 nm

El resultado del análisis para el anticuerpo PM-1 humanizado no alterado, anticuerpo de cadena H C-terminal Δ K y anticuerpo de cadena H C-terminal Δ GK, se muestra en la figura 6. De acuerdo con el documento de no patente 10, un pico básico con tiempo de retención más prolongado que el del pico principal contiene un extremo C de cadena H con Lys en la posición 449 y un extremo C de cadena H con Pro aminada en la posición 447. La intensidad del pico básico era significativamente menor en el anticuerpo de cadena H C-terminal Δ GK, mientras que no se observó reducción significativa en el anticuerpo de cadena H C-terminal Δ K. Esto sugiere que la heterogeneidad C-terminal de la cadena H se puede reducir solo cuando los dos aminoácidos C-terminales se eliminan de la cadena H.

La temperatura de la desnaturalización térmica del anticuerpo de cadena H C-terminal Δ GK se determinó por DSC para evaluar el efecto de la eliminación de los dos restos del extremo C de la cadena H en la estabilidad térmica. Para la medición por DSC, el anticuerpo se dializó contra tampón de ácido acético 20 mM (pH 6,0) que contenía NaCl 150 mM para cambiar el tampón. Después de desaireación completa, las disoluciones del anticuerpo PM-1 humanizado y el anticuerpo de cadena H C-terminal Δ GK, y la disolución de referencia (dializado exterior) se encerraron en celdas calorimétricas, y se equilibraron térmicamente completamente a 40°C. Después, se hizo el barrido de las muestras de 40 a 100°C con una velocidad de aproximadamente 1 K/min. Se asignaron los picos de desnaturalización resultante (Rodolfo et al., *Immunology Letters*, 1999, pág. 47-52). El resultado mostraba que la eliminación C-terminal no tenía efecto en la temperatura de desnaturalización térmica del dominio CH3.

Por lo tanto, la heterogeneidad originada del aminoácido C-terminal se puede reducir sin afectar a la estabilidad térmica del anticuerpo, eliminando la lisina y glicina C-terminales de la región constante de la cadena H a nivel de secuencia de nucleótidos. Puesto que todas las regiones constantes de los anticuerpos humanos IgG1, IgG2 e IgG4

contienen Gly y Lys en las posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración EU en sus secuencias C-terminales, el método de reducción de la heterogeneidad de aminoácidos C-terminales descubierto en este ejemplo y otros, se espera que también sea aplicable a las regiones constantes de la IgG2 e IgG4.

Ejemplo 4. Construcción de M14ΔGK con una nueva secuencia de región constante optimizada

5 Cuando un producto farmacéutico de anticuerpo está dirigido a neutralizar un antígeno, funciones efectoras tales como la ADCC del dominio Fc son innecesarias, y por lo tanto la unión al receptor Fcγ es innecesaria. Se supone que la unión al receptor Fcγ no es favorable desde la perspectiva de la inmunogenicidad y los efectos adversos (documentos de no patente 5 y 6). El anticuerpo IgG1 anti-receptor de IL-6 TOCILIZUMAB no necesita unirse al receptor Fcγ, porque solo necesita unirse específicamente al receptor de IL-6 y neutralizar su actividad biológica con el fin de ser usado como un agente terapéutico para enfermedades asociadas con la IL-6, tales como la artritis reumatoide.

Construcción y evaluación de M14ΔGK, M11ΔGK y M17ΔGK, regiones constantes optimizadas, que no se unen al receptor Fcγ

15 Un posible método para deteriorar la unión al receptor Fcγ es convertir el anticuerpo IgG del isotipo IgG1 al isotipo IgG2 o IgG4 (*Ann. Hematol.*, junio 1998;76(6):231-48). Como método para eliminar completamente la unión al receptor Fcγ, se ha descrito un método de introducción de una alteración artificial en el dominio Fc. Por ejemplo, puesto que las funciones efectoras del anticuerpo anti-CD3 y anticuerpo anti-CD4 producen efectos adversos, se han introducido mutaciones de aminoácidos que no están presentes en la secuencia de tipo natural, en la región de unión al receptor Fcγ del dominio Fc (documentos de no patente 3 y 7), y los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4 que no se unen al receptor Fcγ resultantes están actualmente en ensayos clínicos (documentos de no patentes 5 y 8). De acuerdo con otro informe (documento de patente 3), los anticuerpos que no se unen al receptor Fcγ se pueden preparar convirtiendo el dominio de unión al FcγR de la IgG1 (en las posiciones 233,234, 235, 236, 327, 330 y 331 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de la IgG2 (en las posiciones 233,234, 235 y 236 en el sistema de numeración EU) o la IgG4 (en las posiciones 327, 330 y 331 en el sistema de numeración EU). Sin embargo, si todas las mutaciones anteriores se introducen en la IgG1, se generarán nuevas secuencias de péptidos de nueve aminoácidos, que sirven potencialmente como péptidos de epítopos de linfocitos T no naturales, y esto aumenta el riesgo de inmunogenicidad. El riesgo de inmunogenicidad debería minimizarse en el desarrollo de productos farmacéuticos de anticuerpos.

30 Para superar el problema anterior, se consideraron alteraciones en la región constante de la IgG2. El dominio de unión al FcγR de la región constante de IgG2, restos en las posiciones 327, 330 y 331 en el sistema de numeración EU, es diferente de la secuencia de no unión de la IgG4 mientras que los de las posiciones 233,234, 235 y 236 en el sistema de numeración EU, son aminoácidos de tipo no unión. Por lo tanto, es necesario alterar los aminoácidos en las posiciones 327, 330 y 331 en el sistema de numeración EU, a la secuencia de la IgG4 (G2Δa descrito en *Eur. J. Immunol.*, agosto 1999;29(8):2613-24). Sin embargo, puesto que el aminoácido en la posición 339 en el sistema de numeración EU en la IgG4 es alanina mientras que el correspondiente resto en la IgG2 es treonina, una simple alteración de los aminoácidos en las posiciones 327, 330 y 331 en el sistema de numeración EU a la secuencia de la IgG4, genera de modo desfavorable una nueva secuencia peptídica de 9 aminoácidos, que sirve potencialmente como un péptido epítipo de linfocitos T no naturales, y por lo tanto aumenta el riesgo de inmunogenicidad. Por lo tanto, se encontró que la generación de la nueva secuencia de péptido se podía prevenir introduciendo la sustitución de treonina por alanina en la posición 339 en el sistema de numeración EU en la IgG2, además de la alteración descrita antes.

Además de las mutaciones descritas antes, se introdujeron otras mutaciones, y eran la sustitución de metionina por valina en la posición 397 en el sistema de numeración EU, que se descubrió en el ejemplo 1 para mejorar la estabilidad de la IgG2 en condiciones ácidas; y la sustitución de cisteína por serina en la posición 131 en el sistema de numeración EU, la sustitución de arginina por lisina en la posición 133 en el sistema de numeración EU, y la sustitución de cisteína por serina en la posición 219 en el sistema de numeración EU, que se descubrieron en el ejemplo 2, para mejorar la heterogeneidad originada en los enlaces disulfuro en la región bisagra. Además, puesto que las mutaciones en las posiciones 131 y 133 generan una nueva secuencia de péptido de 9 aminoácidos, que sirve potencialmente como un péptido epítipo de linfocitos T no naturales, y por lo tanto genera el riesgo de inmunogenicidad, la secuencia peptídica alrededor de las posiciones 131 a 139 se convirtió en una secuencia humana natural introduciendo la sustitución del ácido glutámico por glicina en la posición 137 en el sistema de numeración EU y la sustitución de serina por glicina en la posición 138 en el sistema de numeración EU. Además, la glicina y lisina en las posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración EU se eliminaron del extremo C de la cadena H para reducir la heterogeneidad C-terminal. La secuencia de la región constante que tiene todas las mutaciones introducidas se denominó M14ΔGK (M14ΔGK, SEQ ID NO: 5). Aunque hay una mutación de cisteína en la posición 219 a serina en M14ΔGK como nueva secuencia peptídica de 9 aminoácidos que sirve potencialmente como un péptido epítipo de linfocitos T, el riesgo de inmunogenicidad se consideró que era muy bajo, puesto que la propiedad del aminoácido serina es similar al de la cisteína. La predicción de inmunogenicidad por TEPITOPE también sugería que no había diferencia de inmunogenicidad.

60 Se construyó un vector de expresión para la secuencia de la cadena H del anticuerpo cuya región variable era de

tipo natural y la región constante era M14ΔGK (M14ΔGK, SEQ ID NO: 5; WT-M14ΔGK, SEQ ID NO: 19) por el método descrito en el ejemplo de referencia 1. Un anticuerpo que tenía WT-M14ΔGK como cadena H y el tipo natural como cadena L, se expresó y purificó por el método descrito en el ejemplo de referencia 1.

Además, en WT-M11ΔGK (M11ΔGK, SEQ ID NO: 8; WT-M11ΔGK, SEQ ID NO: 21), se introdujeron mutaciones con el mismo método en la región constante de la IgG4 en las posiciones 233, 234, 235 y 236 en el sistema de numeración EU (G4Δb descrito en *Eur. J. Immunol.*, agosto 1999; 29(8):2613-24; esta alteración genera nuevas secuencias no humanas y por lo tanto aumenta el riesgo de inmunogenicidad) para reducir la unión al receptor Fcγ. Además de la alteración anterior, para reducir el riesgo de inmunogenicidad, se introdujeron mutaciones en las posiciones 131, 133, 137, 138, 214, 217, 219, 220, 221 y 222 en el sistema de numeración EU, de modo que el patrón de enlaces disulfuro en la región bisagra era el mismo que el de M14ΔGK; se introdujo una mutación en la posición 409 en el sistema de numeración EU (ejemplo 1) para mejorar la estabilidad en condiciones ácidas; y se eliminaron los aminoácidos en las posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración EU (ejemplo 3) para reducir la heterogeneidad C-terminal.

Además, se construyeron WT-M17ΔGK (M17ΔGK, SEQ ID NO: 10; WT-M17ΔGK, SEQ ID NO: 20) introduciendo mutaciones en la región constante de la IgG1 en las posiciones 233, 234, 235, 236, 327, 330, 331 y 339 en el sistema de numeración EU (G1Δab descrito en *Eur. J. Immunol.*, agosto 1999; 29(8):2613-24) para dificultar la unión al receptor Fcγ y eliminando los aminoácidos en las posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración EU para reducir la heterogeneidad C-terminal (ejemplo 3).

Se usaron WT-M17ΔGK o WT-M11ΔGK como la cadena H y se usó el tipo natural como cadena L. Estos anticuerpos se expresaron y purificaron por el método descrito en el ejemplo 1.

Evaluación de WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK y WT-M11ΔGK para la unión al receptor Fcγ

La unión al FcγRI se evaluó por el procedimiento descrito a continuación. Usando Biacore T100, el receptor de Fcγ I de tipo humano (en lo sucesivo FcγRI) inmovilizado sobre un chip sensor se dejó que interaccionara con IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK o M17ΔGK 7 como analito. Se compararon las cantidades de anticuerpo unido. Las mediciones se llevaron a cabo usando FcRIA/CD64 (R&D systems) recombinante humano como FcγRI de tipo humano, e IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK y M17ΔGK como muestras. El FcγRI se inmovilizó sobre el chip sensor CM5 (BIAcore) por el método de acoplamiento de aminas. La cantidad final de hFcγRI inmovilizado era aproximadamente 13000 RU. El tampón de ejecución usado era HBS-EP+, y el caudal era 20 μl/min. La concentración de muestra se ajustó a 100 μg/ml usando HBS-EP+. El análisis incluía dos etapas: 2 minutos de fase de asociación donde se inyectaron 10 μl de una disolución de anticuerpo y los 4 minutos posteriores de fase de disociación donde la inyección se cambió por HBS-EP+. Después de la fase de disociación, el chip sensor se regeneró por inyección de 20 μl de hidróxido sódico 5 mM. La asociación, disociación y regeneración constituyen un ciclo de análisis. Se inyectaron diferentes disoluciones de anticuerpo para obtener sensores. Como analitos se inyectaron IgG4, IgG2, IgG1, M11, M14 y M17, en este orden. Esta serie de inyecciones se repitió dos veces. El resultado de comparación de datos de las cantidades determinadas de anticuerpo unido se muestra en la figura 7. La comparación muestra que la cantidad de anticuerpo unido se reduce en el orden: IgG1 > IgG4 >> TgG2 = M11ΔGK = M14ΔGK = M17ΔGK. Por lo tanto, se puso de manifiesto que la unión al FcγRI de la IgG2 de tipo natural, M11ΔGK, M14ΔGK, y M17ΔGK era más débil que la de la IgG1 e IgG4 de tipo natural.

La unión al FcγRIIa se evaluó por el procedimiento descrito a continuación. Usando Biacore T100, el receptor Fcγ IIA de tipo humano (en lo sucesivo FcγRIIa) inmovilizado sobre un chip sensor se dejó que interaccionara con IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK o M17ΔGK como analito. Se compararon las cantidades de anticuerpo unido. Las mediciones se llevaron a cabo usando FcRIIA/CD32a recombinante humano (R&D systems) como FcγRIIa de tipo humano, e IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK y M17ΔGK como muestras. El FcγRIIa se inmovilizó sobre el chip sensor CM5 (BIAcore) por el método de acoplamiento de aminas. La cantidad final de FcγRIIa inmovilizado era aproximadamente 3300 UR. El tampón de ejecución usado era HBS-EP+, y el caudal era 20 μl/min. Después, el tampón de ejecución se inyectó hasta que se estabilizó el valor base. La medición se llevó a cabo después de que se estabilizara el valor base. El FcγRIIa inmovilizado se dejó que interaccionara con un anticuerpo de cada isotipo de IgG (IgG1, IgG2 o IgG4) o anticuerpo introducido con mutaciones (M11ΔGK, M14ΔGK o M17ΔGK) como analito. Se observó la cantidad de anticuerpo unido. El tampón de ejecución usado era HBS-EP+, y el caudal era 20 μl/min. La temperatura de medición era 25°C. La concentración de cada IgG o forma alterada de la misma se ajustó a 100 μg/ml. Se inyectaron 20 μl de un analito y se dejaron interaccionar con el FcγRIIa inmovilizado. Después de interacción, el analito se disoció del FcγRIIa y el chip sensor se regeneró inyectando 200 μl de tampón de ejecución. Como analitos, se inyectaron IgG4, IgG2, IgG1, M11ΔGK, M14ΔGK y M17ΔGK, en este orden. Esta serie de inyecciones se repitió dos veces. El resultado de comparación de datos de las cantidades determinadas de anticuerpo unido se muestra en la figura 8. La comparación muestra que la cantidad de anticuerpo unido se reduce en el orden: IgG1 > IgG2 = IgG4 > M11ΔGK = M14ΔGK = M17ΔGK. Por lo tanto, se puso de manifiesto que la unión al FcγRIIa de M11ΔGK, M14ΔGK, y M17ΔGK era más débil que la de las IgG1, IgG2, e IgG4 de tipo natural.

La unión al FcγRIIb se evaluó por el procedimiento descrito a continuación. Usando Biacore T100, el receptor Fcγ IIB de tipo humano (en lo sucesivo FcγRIIb) inmovilizado sobre un chip sensor se dejó que interaccionara con IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK o M17ΔGK como analito. Se compararon las cantidades de anticuerpo unido. Las

mediciones se llevaron a cabo usando FcγRIIB/C recombinante humano (R&D systems) como FcγRIIb de tipo humano, e IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK y M17ΔGK como muestras. El FcγRIIb se inmovilizó sobre el chip sensor CM5 (BIAcore) por el método de acoplamiento de aminas. La cantidad final de FcγRIIb inmovilizado era aproximadamente 4300 UR. Después, se inyectó el tampón de ejecución hasta que se estabilizó el valor base. La medición se llevó a cabo después de que se estabilizara el valor base. El FcγRIIb inmovilizado se dejó que interaccionara con un anticuerpo de cada isotipo de IgG (IgG1, IgG2 o IgG4) o anticuerpo introducido con mutaciones (M11ΔGK, M14ΔGK o M17ΔGK) como analito. Se observó la cantidad de anticuerpo unido. El tampón de ejecución usado era HBS-EP+, y el caudal era 20 μl/min. La temperatura de medición era 25°C. La concentración de cada IgG o forma alterada de la misma se ajustó a 200 μg/ml. Se inyectaron 20 μl de un analito y se dejaron interaccionar con el FcγRIIb inmovilizado. Después de interacción, el analito se disoció del FcγRIIb y el chip sensor se regeneró inyectando 200 μl de tampón de ejecución. Como analitos, se inyectaron IgG4, IgG2, IgG1, M11ΔGK, M14ΔGK y M17ΔGK, en este orden. Esta serie de inyecciones se repitió dos veces. El resultado de comparación de datos de las cantidades determinadas de anticuerpo unido se muestra en la figura 9. La comparación muestra que la cantidad de anticuerpo unido se reduce en el orden: IgG4 > IgG1 > IgG2 > M11ΔGK = M14ΔGK = M17ΔGK. Por lo tanto, se puso de manifiesto que la unión al FcγRIIb de M11ΔGK, M14ΔGK y M17ΔGK era más débil que la de las IgG1, IgG2 e IgG4, de tipo natural.

La unión al FcγRIIIa se evaluó por el procedimiento descrito a continuación. Usando Biacore T100, el receptor FcγRIIIa de tipo humano (en lo sucesivo FcγRIIIa) inmovilizado sobre un chip sensor se dejó que interaccionara con IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK o M17ΔGK como analito. Se compararon las cantidades de anticuerpo unido. Las mediciones se llevaron a cabo usando hFcγRIIIaV-His6 (hFcγRIIIaV-His6 recombinante preparado en la empresa de los autores de la invención) como FcγRIIIa de tipo humano, e IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK y M17ΔGK como muestras. El FcγRIIIa se inmovilizó sobre el chip sensor CM5 (BIAcore) por el método de acoplamiento de aminas. La cantidad final de hFcγRIIIaV-His6 inmovilizado era aproximadamente 8200 UR. El tampón de ejecución usado era HBS-EP+, y el caudal era 5 μl/min. La concentración de la muestra se ajustó a 250 μg/ml usando HBS-EP+. El análisis incluía dos etapas: dos minutos de fase de asociación donde se inyectaron 10 μl de una disolución de anticuerpo y los posteriores 4 minutos de fase de disociación donde la inyección se cambió a HBS-EP+. Después de la fase de disociación, el chip sensor se regeneró inyectando 20 μl de ácido clorhídrico 5 mM. La asociación, disociación y regeneración constituyen un ciclo de análisis. Se inyectaron diferentes disoluciones de anticuerpo para obtener sensogramas. Como analitos se inyectaron IgG4, IgG2, IgG1, M11ΔGK, M14ΔGK y M17ΔGK, en este orden. El resultado de comparación de datos de las cantidades determinadas de anticuerpo unido se muestra en la figura 10. La comparación muestra que la cantidad de anticuerpo unido se reduce en el orden: IgG1 >> IgG4 > IgG2 > M17ΔGK > M11ΔGK = M14ΔGK. Por lo tanto, se puso de manifiesto que la unión al FcγRIIIa de M11ΔGK, M14ΔGK y M17ΔGK era más débil que la de las IgG1, IgG2 e IgG4 de tipo natural. Además, se encontró que la unión al FcγRIIIa de M11ΔGK y M14ΔGK era más débil que la de M17ΔGK que contenía la mutación G1Δab descrita en *Eur. J. Immunol.*, agosto 1999;29(8):2613-24.

El descubrimiento descrito antes demuestra que la unión al receptor Fcγ de M14ΔGK, WT-M17ΔGK y WT-M11ΔGK se reduce notablemente comparado con la IgG1 de tipo natural. El riesgo de inmunogenicidad debido a la internalización mediada por el receptor Fcγ en APC y los efectos adversos causados por la función efectora tal como la ADCC, se pueden evitar usando WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK o WT-M11ΔGK como una región constante. Por lo tanto, WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK y WT-M11ΔGK son útiles como la secuencia de la región constante de productos farmacéuticos de anticuerpos dirigidos a neutralizar antígenos.

Evaluación de la estabilidad de WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK y WT-M11ΔGK a altas concentraciones

Se evaluó la estabilidad de WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK y WT-M11ΔGK a altas concentraciones. Los anticuerpos purificados de WT-IgG1, WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK y WT-M11ΔGK se dializaron contra una disolución de cloruro de histidina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5 (EasySEP, TOMY) y después se concentraron mediante ultrafiltros. Se ensayó la estabilidad de los anticuerpos a altas concentraciones. Las condiciones eran las siguientes.

Anticuerpos: WT-IgG1, WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK y WT-M11ΔGK

Tampón: cloruro de histidina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5

Concentración: 61 mg/ml

Temperatura de almacenamiento y periodo de tiempo: 40°C durante dos semanas, 40°C durante un mes, 40°C durante dos meses.

Método de evaluación de la agregación:

Sistema: Waters Alliance

Columna: G3000SWxl (TOSOH)

Fase móvil: fosfato sódico 50 mM, KCl 300 mM, pH 7,0

Caudal, longitud de onda: 0,5 ml/min, 220 nm

Se analizaron muestras diluidas 100 veces

El contenido de agregados en las formulaciones iniciales (inmediatamente después de la preparación) y las formulaciones almacenadas en diferentes condiciones, se calcularon por cromatografía de filtración en gel descrita antes. Las diferencias (aumento de cantidades) de contenido de agregados con respecto a las formulaciones iniciales se muestran en la figura 11. El resultado mostró que las cantidades de agregados en WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK y WT-M11ΔGK aumentaban solo ligeramente comparado con la WT-IgG1 y eran aproximadamente la mitad del contenido en el tipo natural. Además, como se muestra en la figura 12, el aumento de la cantidad de fragmento Fab era comparable entre WT-IgG1 y WT-M17ΔGK, mientras que el aumento de cantidad en WT-M14ΔGK y WT-M11ΔGK eran aproximadamente una cuarta parte que la cantidad en el tipo natural. Las rutas de degeneración de las formulaciones de anticuerpos de tipo IgG incluyen la formación de agregados y la generación de Fab degradado como se describe en el documento WO 2003/039485. Basándose en los dos criterios, la agregación y la generación de fragmentos Fab, se demostró que WT-M14ΔGK y WT-M11ΔGK tenían estabilidad superior en formulaciones comparado con la WT-IgG1. Por lo tanto, incluso para anticuerpos que tienen una región constante de IgG1 con poca estabilidad y no se podrían preparar como productos farmacéuticos de anticuerpos en formulaciones líquidas de alta concentración, se esperaba que el uso de WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK o WT-M11ΔGK como una región constante permitiera la producción de formulaciones líquidas de alta concentración estables.

En particular, se esperaba que M14ΔGK fuera muy útil como una nueva secuencia de la región constante que (1) superara la inestabilidad de la molécula de IgG2 original en condiciones ácidas; (2) mejorara la heterogeneidad originada en los enlaces disulfuro en la región bisagra; (3) no se uniera al receptor Fcγ; (4) tuviera un número minimizado de nuevas secuencias de péptidos de 9 aminoácidos que sirvieran potencialmente como péptidos epítopos de linfocitos T; y (5) tuviera una mejor estabilidad que la IgG1 en formulaciones de alta concentración.

Ejemplo 5. Preparación y evaluación de M31ΔGK

M14ΔGK preparada en el ejemplo 4 se alteró sustituyendo en la secuencia de IgG2 los aminoácidos en las posiciones 330, 331 y 339 en el sistema de numeración EU para construir M31ΔGK (M31ΔGK, SEQ ID NO: 7). Se construyó un vector de expresión para una secuencia de la cadena H de anticuerpo cuya región variable es WT y secuencia de la región constante es M31ΔGK (WT-M31ΔGK, SEQ ID NO: 22) por el método descrito en el ejemplo de referencia 1. Usando la cadena H WT-M31ΔGK y la cadena L WT, se expresó y purificó WT-M31ΔGK por el método descrito en el ejemplo de referencia 1.

Además de WT-M31ΔGK, se expresaron y purificaron WT-IgG2 y WT-M14ΔGK al mismo tiempo, y se analizaron por cromatografía de intercambio catiónico por el procedimiento descrito a continuación. Las condiciones usadas en el análisis de cromatografía de intercambio catiónico eran las siguientes. Se compararon los cromatogramas para WT-IgG2, WT-M14ΔGK y WT-M31ΔGK.

Columna: ProPac WCX-10 (Dionex)

Fase móvil: A: MES/NaOH 25 mmol/l, pH 6,1

B: MES/NaOH 25 mmol/l, NaCl 250 mmol/l, pH 6,1

Caudal: 0,5 ml/min

Gradiente: 0% de B (5 min) -> (65 min) -> 100% de B -> (1 min)

Detección: 280 nm

El resultado del análisis para WT-IgG2, WT-M14ΔGK y WT-M31ΔGK se muestra en la figura 13. Como WT-M14ΔGK, se demostró que WT-M31ΔGK era eluida como un solo pico, mientras que WT-IgG2 daba múltiples picos. Esto indica que la heterogeneidad derivada de los enlaces disulfuro en la región bisagra de la IgG2 también se puede evitar en WT-M31ΔGK.

Ejemplo 6. Evaluación de la retención en el plasma de WT-M14

Método para calcular la retención en el plasma humano

Se sabe que la retención prolongada (eliminación lenta) de la molécula de IgG en el plasma se debe a la función de FcRn que se conoce como receptor de rescate de la molécula de IgG (*Nat. Rev. Immunol.*, Sep 2007;7(9):715-25). Cuando son absorbidas en los endosomas por pinocitosis, en condiciones ácidas dentro del endosoma (aproximadamente pH 6,0), las moléculas de IgG se unen al FcRn expresado en los endosomas. Mientras que las moléculas de IgG que no se unen al FcRn son transferidas y degradadas en los lisosomas, las unidas al FcRn son translocadas a la superficie celular y después liberadas de nuevo del FcRn al plasma en las condiciones neutras en el plasma (aproximadamente pH 7,4).

Los anticuerpos de tipo IgG conocidos incluyen los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Las semividas en el plasma de estos isotipos en el ser humano se ha descrito que son aproximadamente 36 días para la IgG1 y IgG2; aproximadamente 29 días para la IgG3; y 16 días para la IgG4 (*Nat. Biotechnol.*, dic 2007; 25(12):1369-72). Por lo tanto, se cree que la retención en el plasma de la IgG1 e IgG2 es la más larga. En general, los isotipos de anticuerpos usados como agentes farmacéuticos son IgG1, IgG2 e IgG4. Los métodos descritos para mejorar más la farmacocinética de estos anticuerpos IgG incluyen métodos para mejorar la unión descrita antes al FcRn humano, y esto se logra alterando la secuencia de la región constante de IgG (*J. Biol. Chem.*, 19 de enero 2007;282(3):1709-17; *J. Immunol.*, 1 de enero 2006;176(1):346-56).

Hay diferencias específicas de especie entre el FcRn de ratón y el FcRn humano (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 5 dic 2006;103(49):18709-14). Por lo tanto, para predecir la retención en el plasma de los anticuerpos IgG que tienen una secuencia de la región constante alterada en seres humanos, es conveniente evaluar la unión al FcRn humano y la retención en el plasma en ratones transgénicos con FcRn humano (*Int. Immunol.*, dic 2006; 18(12):1759-69).

Evaluación de la unión al FcRn humano

El FcRn es un complejo de FcRn y microglobulina $\beta 2$. Se prepararon cebadores oligo-ADN basados en la secuencia descrita del gen de FcRn humano (*J. Exp. Med.* (1994) 180 (6), 2377-2381). Se preparó un fragmento de ADN que codifica el gen entero por PCR usando ADNc humano (Human Placenta Marathon-Ready cDNA, Clontech) como molde y los cebadores preparados. Usando el fragmento de ADN obtenido como molde, se amplificó un fragmento de ADN que codifica el dominio extracelular que contiene la región señal (Met1-Leu290) por PCR, y se insertó en un vector de expresión de célula animal (la secuencia de aminoácidos del FcRn humano expuesta en la SEQ ID NO: 24). De la misma forma, se prepararon cebadores oligo-ADN basándose en la secuencia descrita del gen de $\beta 2$ -microglobulina humana (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2002) 99 (26), 16899-16903). Se preparó un fragmento de ADN que codifica el gen entero por PCR usando ADNc humano (Hu-Placenta Marathon-Ready cDNA, CLONTECH) como molde y los cebadores preparados. Usando el fragmento de ADN obtenido como molde, se amplificó un fragmento de ADN que codifica la $\beta 2$ -microglobulina entera que contiene la región señal (Met1-Leu119) por PCR, y se insertó en un vector de expresión de célula animal (la secuencia de aminoácidos de la $\beta 2$ -microglobulina humana expuesta en la SEQ ID NO: 25).

El FcRn humano se expresó por el siguiente procedimiento. Los plásmidos construidos para el FcRn humano y la $\beta 2$ -microglobulina se introdujeron en células de la línea celular obtenida de cáncer renal embrionario HEK293H (Invitrogen) usando suero bovino fetal al 10% (Invitrogen) por lipofección. El líquido sobrenadante del cultivo resultante se recogió y el FcRn se purificó usando IgG Sepharose 6 Fast Flow (Amersham Biosciences) por el método descrito en *J. Immunol.*, 1 nov 2002; 169(9):5171-80, seguido de purificación adicional usando HiTrap Q HP (GE Healthcare).

La unión al FcRn humano se evaluó usando Biacore 3000. Se unió un anticuerpo a la proteína L o anticuerpo de conejo anti-cadena kappa de IgG humana inmovilizado sobre un chip sensor, se añadió FcRn humano como analito para la interacción con el anticuerpo, y se calculó la afinidad (KD) a partir de la cantidad de FcRn humano unido. Específicamente, la proteína L o anticuerpo de conejo anti-cadena kappa de IgG humana se inmovilizó sobre el chip sensor CM5 (BIAcore) por el método de acoplamiento de amina usando tampón de fosfato Na 50 mM (pH 6,0) que contenía NaCl 150 mM como tampón de ejecución. Después, se diluyó un anticuerpo con un tampón de ejecución que contenía Tween20 al 0,02% y se inyectó para unirlo al chip. Después, se inyectó el FcRn humano y se evaluó la unión del FcRn humano al anticuerpo.

La afinidad se calculó usando el programa BIAevaluation. El sensograma obtenido se usó para calcular la cantidad de FcRn unido al anticuerpo inmediatamente antes del final de la inyección del FcRn humano. La afinidad del anticuerpo por el FcRn humano se calculó por ajuste con el método de afinidad de estado de equilibrio.

Evaluación de la retención en el plasma en ratones transgénicos con FcRn humano

La farmacocinética en ratones transgénicos con FcRn humano (ratones Tg línea 276 +/- B6.mFcRn-/-hFcRn; Jackson Laboratories) se evaluó por el siguiente procedimiento. Se administró un anticuerpo por vía intravenosa una vez con una dosis de 1 mg/kg a los ratones, y se recogió sangre en los tiempos de medición adecuados. La sangre recogida se centrifugó inmediatamente a 15.000 rpm y 4°C durante 15 min para obtener el plasma sanguíneo. El plasma separado se almacenó en un refrigerador a -20°C o menos hasta su uso. La concentración plasmática se determinó por ELISA.

Evaluación predictiva de la retención en el plasma de WT-M14 en seres humanos

La unión de WT-IgG1 y WT-M14 al FcRn humano se evaluó por BIAcore. Como se muestra en la tabla 1, el resultado indicaba que la unión de WT-M14 era ligeramente mayor que la de WT-IgG1.

Tabla 1

	KD (μ M)
WT-IgG1	2,07
WT-M14	1,85

Sin embargo, como se muestra en la figura 14, la retención en el plasma era comparable entre la WT-IgG1 y WT-M14 cuando se evaluó usando ratones transgénicos con FcRn humano. Este descubrimiento sugiere que la retención en el plasma de la región constante M14 en seres humanos es comparable a la de la región constante de IgG1.

Ejemplo 7. Preparación de WT-M44, WT-M58 y WT-M73 que tienen mejor farmacocinética

Preparación de la molécula de WT-M58

Como se describe en el ejemplo 6, la retención en el plasma de WT-M14 en ratones transgénicos con FcRn humano era comparable a la de WT-IgG1. Los métodos conocidos para mejorar la farmacocinética incluyen aquellos para bajar el punto isoeléctrico de un anticuerpo y aquellos que potencian la unión al FcRn. Aquí, se introdujeron las modificaciones descritas a continuación para mejorar la farmacocinética de WT-M14. Específicamente, se introdujeron las siguientes sustituciones en WT-M31 Δ GK, que se preparó a partir de WT-M14 como se describe en el ejemplo 4: sustitución de valina por metionina en la posición 397; sustitución de histidina por glutamina en la posición 268; sustitución de arginina por glutamina en la posición 355; y sustitución de glutamina por ácido glutámico en la posición 419 en el sistema de numeración EU. Estas cuatro sustituciones se introdujeron en WT-M31 Δ GK para generar WT-M58 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26). Los vectores de expresión se prepararon por el mismo método descrito en el ejemplo 1. Se usaron WT-M58 y L(WT) como la cadena H y la cadena L, respectivamente. WT-M58 se expresó y purificó por el método descrito en el ejemplo 1.

Construcción de la molécula WT-M73

Por otra parte, WT-M44 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27) se generó introduciendo en la IgG1 una sustitución por alanina del aminoácido en la posición 434, numeración EU. WT-M83 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58) también se generó por eliminaciones de la glicina en la posición 446, numeración EU y la lisina en la posición 447, numeración EU, para reducir la heterogeneidad C-terminal de la cadena H. Además, WT-M73 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 28) se generó introduciendo en WT-M58 una sustitución por alanina en la posición 434, numeración EU.

Los vectores de expresión para los anticuerpos anteriores se construyeron por el método descrito en el ejemplo 1. Se usó WT-M44, WT-M58 o WT-M73 como la cadena H, mientras que se usó L (WT) como la cadena L. WT-M44, WT-M58 y WT-M73 se expresaron y purificaron por el método descrito en el ejemplo 1.

Evaluación predictiva de la retención en el plasma de WT-M44, WT-M58 y WT-M73 en seres humanos

La unión de WT-IgG1, WT-M44, WT-M58 y WT-M73 al FcRn humano se evaluó por BIAcore. Como se muestra en la tabla 2, el resultado indica que las uniones de WT-M44, WT-M58 y WT-M73 son mayores que la de WT-IgG1, y aproximadamente 2,7, 1,4 y 3,8 veces la de WT-IgG1, respectivamente.

Tabla 2

	KD(μ M)
WT-IgG1	1,62
WT-M44	0,59
WT-M58	1,17
WT-M73	0,42

Como resultado de evaluar la retención en el plasma de WT-IgG1, WT-M14 y WT-M58 en ratones transgénicos con FcRn humano, como se muestra en la figura 24, se confirmó que WT-M58 tenía mayor retención en el plasma con respecto a WT-IgG1 y WT-M14. Además, se evaluó la retención en el plasma de WT-IgG1, WT-M44, WT-M58 y WT-M73 en ratones transgénicos con FcRn humano. Como se muestra en la figura 15, se confirmó que todos, WT-M44, WT-M58 y WT-M73, tenían farmacocinética mejorada con respecto a la WT-IgG1. El efecto de mejora de la

farmacocinética se correlacionaba con la actividad de unión al FcRn humano. En particular, el nivel en el plasma de WT-M73 el día 28 era mejor en aproximadamente 16 veces que el de WT-IgG1. Este descubrimiento sugiere que la farmacocinética de los anticuerpos con la región constante M73 en seres humanos también es potenciada significativamente comparada con anticuerpos con la región constante de IgG1.

5 Ejemplo 8. Efecto de las nuevas regiones constantes M14 y M58 en la reducción de la heterogeneidad en diferentes anticuerpos

Como se describe en el ejemplo 4, se demostró que la heterogeneidad originada en la región bisagra de la IgG2 se podía reducir convirtiendo la región constante de IgG2 en M14 en el anticuerpo PM1 anti-receptor de IL6 humanizado (WT). También se ensayaron otros anticuerpos de tipo IgG2 distintos del anticuerpo PM1 humanizado para evaluar si la heterogeneidad se podía reducir convirtiendo sus regiones constantes en M14 o M58.

Los anticuerpos distintos del anticuerpo PM1 humanizado eran: el anticuerpo F2H/L39 anti-receptor de IL-6 (las secuencias de aminoácidos de F2H/L39_VH y F2H/L39_VL se exponen en las SEQ ID NO: 29 y 30, respectivamente); anticuerpo H0L0 anti-receptor de IL-31 (las secuencias de aminoácidos de H0L0_VH y H0L0_VL se exponen en las SEQ ID NO: 31 y 32, respectivamente); y anticuerpo DNS anti-RANKL (las secuencias de aminoácidos de DNS_VH y DNS_VL se exponen en las SEQ ID NO: 33 y 34, respectivamente). Para cada uno de estos anticuerpos, se generaron anticuerpos con la región constante de IgG1 (SEQ ID NO: 1), región constante de IgG2 (SEQ ID NO: 2), o M14 (SEQ ID NO: 5) o M58 (SEQ ID NO: 35).

Se evaluó en los anticuerpos generados la heterogeneidad por cromatografía de intercambio catiónico usando un gradiente adecuado y un caudal adecuado en una columna ProPac WCX-10 (Dionex) (fase móvil A: acetato sódico 20 mM (pH 5,0), fase móvil B: acetato sódico 20 mM/NaCl 1 M (pH 5,0)). El resultado de la evaluación obtenido por cromatografía de intercambio catiónico (IEC) se muestra en la figura 16.

Como se muestra en la figura 16, se demostró que la conversión de la región constante desde un tipo de IgG1 a un tipo de IgG2 aumentaba la heterogeneidad no solo en el anticuerpo PM1 anti-receptor de IL6 humanizado (WT), sino también en el anticuerpo F2H/L39 anti-receptor de IL-6, en anticuerpo H0L0 anti-receptor de IL-31 y el anticuerpo DNS anti-RANKL. En cambio, la heterogeneidad se podía reducir en todos estos anticuerpos convirtiendo su región constante en M14 o M58. Por lo tanto, se demostró que, independientemente del tipo de antígeno o secuencia de la región variable del anticuerpo, se podía reducir la heterogeneidad originada en la IgG2 natural, sustituyendo cisteínas por serinas en la posición 131, numeración EU, en el dominio CH1 de la cadena H y la posición 219, numeración EU, en la región superior de la bisagra de la cadena H.

30 Ejemplo 9. Efecto de la nueva región constante M58 para mejorar la farmacocinética en diferentes anticuerpos

Como se describe en el ejemplo 7, se demostró que la conversión de la región constante de IgG1 en M58 en el anticuerpo PM1 anti-receptor de IL6 humanizado (WT) mejoraba la unión al FcRn humano y la farmacocinética en los ratones transgénicos con FcRn humano. Por lo tanto, también se ensayaron anticuerpos de tipo IgG1 distintos del anticuerpo PM1 humanizado para evaluar si su farmacocinética se puede mejorar convirtiendo su región constante en M58.

Anticuerpos distintos del anticuerpo PM1 humanizado (WT) eran el anticuerpo H0L0 anti-receptor de IL-31 (las secuencias de aminoácidos de H0L0_VH y H0L0_VL se exponen en las SEQ ID NO: 31 y 32, respectivamente); y anticuerpo DNS anti-RANKL (las secuencias de aminoácidos de DNS_VH y DNS_VL se exponen en las SEQ ID NO: 33 y 34, respectivamente). Para cada uno de estos anticuerpos, se generaron anticuerpos con la región constante de IgG1 (SEQ ID NO: 1) o M58 (SEQ ID NO: 35) y se evaluó su unión al FcRn humano por los métodos descritos en el ejemplo 6. El resultado se muestra en la tabla 3.

Tabla 3

	KD (μ M)		
	WT	H0L0	DNS
IgG1	1,42	1,07	1,36
M58	1,03	0,91	1,03

Como se muestra en la tabla 3, se demostró que como resultado de la conversión de la región constante del tipo IgG1 a M58, como con el anticuerpo anti-receptor de IL-6 WT, se mejoraron las uniones tanto del anticuerpo H0L0 anti-receptor de IL-31 como del anticuerpo DNS anti-RANKL al FcRn humano. Esto sugiere la posibilidad de que independientemente del tipo de antígeno o secuencia de la región variable del anticuerpo, la farmacocinética en el ser humano mejora por la conversión de la región constante del tipo IgG1 a M58.

Ejemplo 10. Efecto de la cisteína en el dominio CH1 en la heterogeneidad y estabilidad

Como se describe en el ejemplo 2, las cisteínas en la región bisagra y el dominio CH1 de la IgG2 se sustituyeron para disminuir la heterogeneidad de la IgG2 natural. La evaluación de diferentes anticuerpos alterados puso de manifiesto que la heterogeneidad se podía reducir sin disminuir la estabilidad usando SKSC (SEQ ID NO: 38). SKSC (SEQ ID NO: 38) es una región constante alterada obtenida sustituyendo la cisteína por serina en la posición 131 y la arginina por lisina en la posición 133, numeración EU, en el dominio CH1 de la cadena H, y la cisteína por serina en la posición 219, numeración EU, en la región bisagra superior de la cadena H de la secuencia de la región constante de IgG2 de tipo natural.

Mientras, otro posible método para disminuir la heterogeneidad es una sola sustitución de cisteína por serina en la posición 219, o de cisteína por serina en la posición 220, numeración EU, en la región bisagra superior de la cadena H. La región constante de la IgG2 alterada SC (SEQ ID NO: 39) se preparó sustituyendo la cisteína por serina en la posición 219 y CS (SEQ ID NO: 40) se preparó sustituyendo la cisteína por serina en la posición, numeración EU, en la IgG2. WT-SC (SEQ ID NO: 41) y WT-CS (SEQ ID NO: 42) se prepararon para tener SC y CS, respectivamente, y se compararon con WT-IgG1, WT-IgG2, WT-SKSC y WT-M58 en términos de heterogeneidad y estabilidad térmica. Además, F2H/L39-IgG1, F2H/L39-IgG2, F2H/L39-SC, F2H/L39-CS, F2H/L39-SKSC y F2H/L39-M14, que tienen la región constante de IgG1 (SEQ ID NO: 1), IgG2 (SEQ ID NO: 2), SC (SEQ ID NO: 39), CS (SEQ ID NO: 40), SKSC (SEQ ID NO: 38), o M14 (SEQ ID NO: 5), respectivamente, se prepararon a partir de F2H/L39 (las secuencias de aminoácidos F2H/L39_VH y F2H/L39_VL expuestas en las SEQ ID NO: 29 y 30, respectivamente), que es un anticuerpo anti-receptor de IL-6 diferente del WT. Los anticuerpos se compararon en relación con la heterogeneidad.

Se evaluó la heterogeneidad de WT-IgG1, WT-IgG2, WT-SC, WT-CS, WT-SKSC, WT-M58, F2H/L39-IgG1, F2H/L39-IgG2, F2H/L39-SC, F2H/L39-CS, F2H/L39-SKSC y F2H/L39-M14, por cromatografía de intercambio catiónico usando un gradiente adecuado y un caudal adecuado en una columna ProPac WCX-10 (Dionex) (fase móvil A: acetato sódico 20 mM (pH 5,0), fase móvil B: acetato sódico 20 mM/NaCl 1 M (pH 5,0)). El resultado de la evaluación obtenida por cromatografía de intercambio catiónico se muestra en la figura 17.

Como se muestra en el figura 17, se demostró que la conversión de la región constante de un tipo de IgG1 a un tipo de IgG2 aumentaba la heterogeneidad tanto en WT como en F2H/L39. En cambio, la heterogeneidad disminuía significativamente convirtiendo la región constante en SKSC y M14 o M58. Mientras, la conversión de la región constante en SC disminuía significativamente la heterogeneidad, como en el caso de SKSC. Sin embargo, la conversión en CS no mejoraba suficientemente la heterogeneidad.

Además de la baja heterogeneidad, en general se desea una alta estabilidad cuando se preparan formulaciones estables en el desarrollo de productos farmacéuticos de anticuerpos. Por lo tanto, para evaluar la estabilidad, la temperatura del punto medio de la desnaturalización térmica (valor de T_m) se determinó por calorimetría diferencial de barrido (DSC) (VP-DSC; Microcal). La temperatura del punto medio de la desnaturalización térmica (T_m) sirve como un indicador de la estabilidad. Con el fin de preparar formulaciones estables como agentes farmacéuticos, se prefiere una temperatura de punto medio mayor de la desnaturalización térmica (valor de T_m) (*J. Pharm. Sci.*, abril 2008; 97(4):1414-26). WT-IgG1, WT-IgG2, WT-SC, WT-CS, WT-SKSC y WT-M58 se dializaron (EasySEP; TOMY) contra una disolución de acetato sódico 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0. La medición por DSC se llevó a cabo a una velocidad de calentamiento de 1°C/min en un intervalo de 40 a 100°C, y con una concentración de proteína de aproximadamente 0,1 mg/ml. Las curvas de desnaturalización obtenidas por DSC se muestran en la figura 18. Los valores de T_m de los dominios Fab se dan en la siguiente tabla 4.

Tabla 4

	T _m /°C
WT-IgG1	94,8
WT-IgG2	93,9
WT-SC	86,7
WT-CS	86,4
WT-SKSC	93,7
WT-M58	93,7

Los valores de T_m de WT-IgG1 y WT-IgG2 era casi iguales (aproximadamente 94°C; T_m de IgG2 era aproximadamente 1°C inferior). Mientras que los valores de T_m de WT-SC y WT-CS eran aproximadamente 86°C y por lo tanto significativamente menores que los de WT-IgG1 y WT-IgG2. Por otra parte, los valores de T_m de WT-M58 y WT-SKSC eran aproximadamente 94°C y comparables a los de WT-IgG1 y WT-IgG2. Esto sugiere que WT-SC y WT-CS son notablemente inestables comparados con la IgG2, y por lo tanto, se prefieren WT-M58 y WT-SKSC, los cuales comprenden ambos sustitución de cisteína por serina en el dominio CH1, en el desarrollo de

productos farmacéuticos de anticuerpos. La razón para la disminución significativa de T_m en WT-SC y WT-CS con respecto a IgG2 se cree que son las diferencias en el patrón de enlaces disulfuro entre WT-SC o WT-CS y la IgG2.

Además, la comparación de las curvas de desnaturalización de DSC mostraba que WT-IgG1, WT-SKSC y WT-M58 daba cada uno un pico de desnaturalización único y agudo para el dominio Fab. En cambio, WT-SC y WT-CS daba cada uno un pico de desnaturalización más ancho para el dominio Fab. WT-IgG2 daba también un hombro en el lado de temperatura inferior del pico de desnaturalización del dominio Fab. En general, se considera que un solo componente da un pico de desnaturalización agudo en DSC, y cuando hay presentes dos o más componentes con diferentes valores de T_m (en concreto, heterogeneidad), el pico de desnaturalización se hace más ancho. Específicamente, el resultado descrito antes sugiere la posibilidad de que cada uno de WT-IgG2, WT-SC y WT-CS contiene dos o más componentes, y por lo tanto la heterogeneidad de la IgG2 natural no se ha reducido suficientemente en WT-SC y WT-CS. Este descubrimiento sugiere que no solo las cisteínas en la región bisagra sino también las del dominio CH1, están implicadas en la heterogeneidad de IgG2-tipo natural, y es necesario alterar no solo las cisteínas en la región bisagra sino también las del dominio CH1 para disminuir la heterogeneidad por DSC. Además, como se ha descrito antes, la estabilidad comparable a la de la IgG2 de tipo natural solo se puede lograr cuando se sustituyen las cisteínas tanto en la región bisagra como en el dominio CH1.

El descubrimiento anterior sugiere que desde la perspectiva de la heterogeneidad y estabilidad, SC y CS, que son regiones constantes introducidas con sustitución por serina de solo la cisteína de la región bisagra, son insuficientes como regiones constantes para disminuir la heterogeneidad originada en la región bisagra de la IgG2. Por lo tanto, se descubrió que la heterogeneidad se podía disminuir significativamente mientras que se mantenía una estabilidad equivalente a la IgG2, solo cuando la cisteína en la posición 131, numeración EU, en el dominio CH1 se sustituía por serina además de la cisteína de la región bisagra. Dichas regiones constantes incluyen M14, M31, M58 y M73 descritas antes. En particular, M58 y M73 son estables y menos heterogéneas, y presentan mejor farmacocinética, y por lo tanto se espera que sean muy útiles como regiones constantes para productos farmacéuticos de anticuerpos.

Ejemplo 11. Generación de anticuerpos anti-receptor de IL-6 totalmente humanizados con PK/PD mejorada

Para generar un anticuerpo anti-receptor de IL-6 totalmente humanizado con PK/PD mejorada, se crearon las moléculas descritas a continuación alterando TOCILIZUMAB (cadena H, WT-IgG1 (SEQ ID NO: 12); cadena L, WT (SEQ ID NO: 15)). Se prepararon los siguientes anticuerpos anti-receptor de IL-6 totalmente humanizados que usaban como región constante M73 o M83 preparados en el ejemplo 7:

Fv3-M73 (cadena H, VH4-M73, SEQ ID NO: 48; cadena L, VL1-kappa, SEQ ID NO: 49),

Fv4-M73 (cadena H, VH3-M73, SEQ ID NO: 46; cadena L, VL3-kappa, SEQ ID NO: 47), y

Fv5-M83 (cadena H, VH5-M83, SEQ ID NO: 44; cadena L, VL5-kappa, SEQ ID NO: 45).

Las afinidades de Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 preparados contra el receptor de IL-6 se compararon con las de TOCILIZUMAB. Las afinidades de estos anticuerpos anti-receptor de IL-6 determinadas se muestran en la tabla 5 (véase el ejemplo de referencia para el método). Además, sus actividades neutralizantes de BaF/gp130 se compararon con las de TOCILIZUMAB y el control (el anticuerpo anti-receptor de IL-6 de alta afinidad conocido descrito en el ejemplo de referencia, y VQ8F11-21 hlgG1 descrito en el documento US 2007/0280945) (véase el ejemplo de referencia para el método). Los resultados obtenidos determinando las actividades biológicas de estos anticuerpos usando BaF/gp130 se muestran en la figura 19 (TOCILIZUMAB, el control, y Fv5-M83 con una concentración final de IL-6 de 300 ng/ml) y la figura 20 (TOCILIZUMAB, Fv3-M73 y Fv4-M73 con una concentración final de IL-6 de 30 ng/ml). Como se muestra en la tabla 5, Fv3-M73 y Fv4-M73 tienen una afinidad de aproximadamente dos a tres veces mayor que TOCILIZUMAB, mientras que Fv5-M83 presenta una afinidad de aproximadamente 100 veces mayor que TOCILIZUMAB (puesto que era difícil medir la afinidad de Fv5-M83, en su lugar se determinó la afinidad usando Fv5-IgG1, que tiene una región constante de tipo IgG1; en general se cree que la región constante no tiene efecto en la afinidad). Como se muestra en la figura 20, Fv3-M73 y Fv4-M73 presentan actividades ligeramente más fuertes que TOCILIZUMAB. Como se muestra en la figura 19, Fv5-M83 tiene una actividad muy fuerte, que es más de 100 veces mayor que la de TOCILIZUMAB, en términos de concentración inhibidora de 50%. Fv5-M83 también presenta una actividad neutralizante aproximadamente 100 veces mayor en términos de concentración inhibidora de 50%, que el control (el anticuerpo anti-receptor de IL-6 de alta afinidad conocido).

Tabla 5

	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
TOCILIZUMAB	4,0E+05	1,1E-03	2,7E-09
Fv3-M73	8,5E+05	8,7E-04	1,0E-09
Fv4-M73	7,5E+05	1,0E-03	1,4E-09
Fv5-M83	1,1E+06	2,8E-05	2,5E-11

Los puntos isoeléctricos de TOCILIZUMAB, el control, Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83, se determinaron por enfoque isoeléctrico usando un método conocido para los expertos en la técnica. El resultado mostraba que el punto isoeléctrico era aproximadamente 9,3 para TOCILIZUMAB; aproximadamente de 8,4 a 8,5 para el control; aproximadamente de 5,7 a 5,8 para Fv3-M73; aproximadamente de 5,6 a 5,7 para Fv4-M73; y de 5,4 a 5,5 para Fv5-M83. Por lo tanto, cada uno de los anticuerpos tenía un punto isoeléctrico significativamente menor cuando se comparaba con TOCILIZUMAB y el control. Además, el punto isoeléctrico teórico de las regiones variables VH/VL se calculó mediante GENETYX (GENETYX CORPORATION). El resultado mostraba que el punto isoeléctrico teórico era 9,20 para TOCILIZUMAB; 7,79 para el control; 5,49 para Fv3-M73; 5,01 para Fv4-M73; y 4,27 para Fv5-M83. Por lo tanto, cada uno de los anticuerpos tenía un punto isoeléctrico significativamente menor cuando se comparaba con TOCILIZUMAB y el control. Por consiguiente, se pensó que la farmacocinética de Fv3-M73, Fv4-M73, y Fv5-M83 había mejorado comparada con TOCILIZUMAB y el control.

Se analizaron los epítomos de linfocitos T en la secuencia de la región variable de TOCILIZUMAB, Fv3-M73, Fv4-M73 o Fv5-M83 usando TEPITOPE (*Methods.*, dic 2004; 34(4):468-75). Como resultado, se predijo que TOCILIZUMAB tenía epítomos de linfocitos T, de los cuales muchos se podían unir a HLA. En cambio, el número de secuencias que se predijo que se unían a epítomos de linfocitos T era significativamente menor en Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83. Además, la región armazón de Fv3-M73, Fv4-M73 o Fv5-M83 no tiene secuencia de ratón y por lo tanto está completamente humanizado. Estos descubrimientos sugieren la posibilidad de que el riesgo de inmunogenicidad esté significativamente reducido en Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 cuando se compara con TOCILIZUMAB.

Ejemplo 12. Ensayo de PK/PD de los anticuerpos anti-receptor de IL-6 totalmente humanizados en macacos

Cada uno de TOCILIZUMAB, el control, Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83, se administraron por vía intravenosa una vez con una dosis de 1 mg/kg a macacos cangrejeros para evaluar la evolución temporal de sus concentraciones plasmáticas (véase el ejemplo de referencia para el método). La evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de TOCILIZUMAB, Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 después de administración intravenosa se muestra en la figura 21. El resultado mostraba que cada uno de Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 presentaba farmacocinética mejorada en los macacos cangrejeros cuando se comparaba con TOCILIZUMAB y el control. De ellos, Fv3-M73 y Fv4-M73 presentaban farmacocinética sustancialmente mejorada cuando se comparaba con TOCILIZUMAB.

Se evaluó la eficacia de todos los anticuerpos para neutralizar el receptor de IL-6 de macaco cangrejero unido a membrana. Se administró IL-6 de macaco cangrejero por vía subcutánea en la región lumbar con 5 µg/kg cada día desde el día 6 al día 18 después de administración del anticuerpo (día 3 a día 10 para TOCILIZUMAB), y la concentración de CRP en todos los animales se determinó 24 horas más tarde (véase el ejemplo de referencia para el método). La evolución temporal de la concentración de CRP después de administración de cada anticuerpo se muestra en la figura 22. Para evaluar la eficacia de cada anticuerpo para neutralizar el receptor de IL-6 de macaco cangrejero soluble, se determinó la concentración plasmática del receptor de IL-6 de macaco cangrejero soluble libre en los macacos cangrejeros y se calculó el porcentaje de neutralización del receptor de IL-6 soluble (véase el ejemplo de referencia para el método). La evolución temporal del porcentaje de neutralización del receptor de IL-6 soluble después de administración de cada anticuerpo, se muestra en la figura 23.

Todos los Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83, neutralizaban el receptor de IL-6 de macaco cangrejero unido a membrana de una forma más sostenible, y suprimían el aumento de CRP a lo largo de un periodo de tiempo más largo cuando se comparaban con TOCILIZUMAB y el control (el anticuerpo anti-receptor de IL-6 de alta afinidad conocido). Además todos los Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 neutralizaban el receptor de IL-6 de macaco cangrejero soluble de una forma más sostenible, y suprimían el aumento del receptor de IL-6 de macaco cangrejero soluble libre a lo largo de un periodo de tiempo más largo cuando se comparaban con TOCILIZUMAB y el control. Estos descubrimientos demuestran que todos los Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 son superiores manteniendo la neutralización de receptores de IL-6 unidos a membrana y solubles, que TOCILIZUMAB y el control. De ellos, Fv3-M73 y Fv4-M73 son notablemente superiores en mantener la neutralización. Mientras que Fv5-M83 suprimía CRP y el receptor de IL-6 de macaco cangrejero soluble de forma más fuerte que Fv3-M73 y Fv4-M73. Por lo tanto, Fv5-M83 se considera que es más fuerte que Fv3-M73, Fv4-M73 y el control (el anticuerpo anti-receptor de IL-6 de alta afinidad conocido) en la neutralización de los receptores de IL-6 unidos a membrana y solubles. Se consideró que los resultados in vivo de los macacos cangrejeros reflejaban la afinidad más fuerte de Fv5-M83 por el receptor de IL-6 y la actividad biológica más fuerte de Fv5-M83 en el sistema de ensayo BaF/gp130 con respecto al control.

Estos descubrimientos sugieren que Fv3-M73 y Fv4-M73 son muy superiores en el mantenimiento de sus actividades como un anticuerpo neutralizante anti-receptor de IL-6 cuando se comparaba con TOCILIZUMAB y el control, y por lo tanto permiten reducir significativamente la dosis y la frecuencia de administración. Además, se demostró que Fv5-M83 era notablemente superior en términos de fuerza de actividad como un anticuerpo neutralizante anti-receptor de IL-6, así como manteniendo su actividad. Por lo tanto, se espera que Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 sean útiles como antagonistas de IL-6 farmacéuticos.

Ejemplo de referencia

Preparación de receptor de IL-6 recombinante soluble de macaco cangrejero (cIL-6R)

Se prepararon cebadores de oligo-ADN basándose en la secuencia de gen descrita para el receptor de IL-6 del macaco Rhesus (Birney et al., *Ensembl* 2006, *Nucleic Acids Res.*, 1 enero 2006; 34 (número de base de datos):D556-61). Se preparó un fragmento de ADN que codificaba el gen del receptor de IL-6 de macaco cangrejero entero por PCR usando los cebadores, y como molde ADNc preparado a partir del páncreas del macaco cangrejero. El fragmento de ADN resultante se insertó en un vector de expresión de célula animal, y se preparó una línea de CHO de expresión estable (línea de células CHO que producen cyno.sIL-6R) usando el vector. El medio de cultivo de células CHO que producen cyno.sIL-6R se purificó usando una columna HisTrap (GE Healthcare Bioscience) y después se concentró con Amicon Ultra-15 Ultracel-10k (Millipore). Se obtuvo una muestra purificada final del receptor de IL-6 de macaco cangrejero soluble (en lo sucesivo cIL-6R) por purificación adicional en una columna de filtración en gel Superdex200pg16/60 (GE Healthcare Bioscience).

Preparación de IL-6 recombinante de macaco cangrejero (cIL-6)

Se preparó IL-6 de macaco cangrejero por el procedimiento descrito a continuación. Se preparó la secuencia de nucleótidos que codifica 212 aminoácidos depositada en SWISSPROT con el n° de acceso P79341 y se clonó en un vector de expresión de célula animal. El vector resultante se introdujo en células CHO para preparar una línea de células de expresión estable (línea de células CHO que producen cyno.sIL-6). El medio de cultivo de las células CHO que producen cyno.sIL-6 se purificó usando una columna de SP-Sepharose/FF (GE Healthcare Bioscience) y después se concentró con Amicon Ultra-15 Ultracel-5k (Millipore). Se obtuvo una muestra final purificada de IL-6 de macaco cangrejero (en lo sucesivo cIL-6) por purificación adicional en una columna de filtración en gel Superdex75pg26/60 (GE Healthcare Bioscience), seguido de concentración con Amicon Ultra-15 Ultracel-5k (Millipore).

Preparación de un anticuerpo anti-receptor de IL-6 de alta afinidad conocido

Se construyó un vector de expresión de célula animal para expresar VQ8F11-21 hIgG1, un anticuerpo anti-receptor de IL-6 de alta afinidad conocido. VQ8F11-21 hIgG1 se describe en el documento US 2007/0280945 A1 (US 2007/0280945 A1; las secuencias de aminoácidos de la cadena H y la cadena L se exponen en las SEQ ID NO: 19 y 27, respectivamente). La región variable del anticuerpo se construyó por PCR usando una combinación de oligo-ADN sintéticos (PCR de ensamblaje). Se usó IgG1 como la región constante. Las regiones variable y constante del anticuerpo se combinaron entre sí por PCR de ensamblaje, y después se insertaron en un vector de expresión de célula animal para construir vectores de expresión para la cadena H y la cadena L de interés. Las secuencias de nucleótidos de los vectores de expresión resultantes se determinaron por un método conocido por el experto en la técnica. El anticuerpo anti-receptor de IL-6 de alta afinidad (en lo sucesivo abreviado como "control") se expresó y purificó usando los vectores de expresión construidos por el método descrito en el ejemplo 1.

Evaluación de la actividad biológica por células BaF3 que expresan gp130 humano (BaF3/gp130)

La actividad neutralizante del receptor de IL-6 se evaluó usando BaF3/gp130 que proliferan de una forma dependiente de IL-6/receptor de IL-6. Después de tres lavados con RPMI1640 complementado con FBS al 10%, se suspendieron células BaF3/gp130 con 5×10^4 células/ml en RPMI1640 complementado con interleuquina 6 humana 600 ng/ml o 60 ng/ml (TORAY) (concentración final de 300 ng/ml o 30 ng/ml, respectivamente), cantidad adecuada del receptor de IL-6 humano soluble recombinante (SR344), y FBS al 10%. Las suspensiones celulares se dispensaron (50 µl/pocillo) en placas de 96 pocillos (CORNING). Después, los anticuerpos purificados se diluyeron con RPMI1640 que contenía FBS al 10%, y se añadieron a cada pocillo (50 µl/pocillo). Las células se cultivaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 3 días. Se diluyó reactivo WST-8 (Cell Counting Kit-8; Dojindo Laboratories) dos veces con PBS. Inmediatamente después, se añadieron 20 µl del reactivo a cada pocillo, se midió la absorbancia a 450 nm (longitud de onda de referencia: 620 nm) usando SUNRISE CLASSIC (TECAN). Después de cultivo durante 2 horas, se midió de nuevo la absorbancia a 450 nm (longitud de onda de referencia: 620 nm). La actividad neutralizante del receptor de IL-6 se evaluó usando el cambio de absorbancia durante dos horas como un indicador.

Análisis basado en Biacore de la unión al receptor de IL-6

Se analizó la cinética de reacción de antígeno-anticuerpo usando Biacore T100 (GE Healthcare). Se midió la interacción SR344-anticuerpo inmovilizando cantidades adecuadas de F(ab')₂ anti-IgG (específico de cadena γ) sobre un chip sensor por el método de acoplamiento de amina, uniendo los anticuerpos de interés sobre el chip a pH 7,4, y después pasando el receptor de IL-6 SR344 ajustado a varias concentraciones a pH 7,4 sobre el chip como un analito. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 37°C. Los parámetros cinéticos, la constante de velocidad de asociación k_a (1/Ms) y la constante de velocidad de disociación k_d (1/s) se calcularon a partir de los sensogramas obtenidos por medición. Después, se determinó la K_D (M) basándose en las constantes de velocidad. Los respectivos parámetros se determinaron usando el programa de Biacore T100 Evaluation (GE Healthcare).

Ensayo de PK/PD para determinar las concentraciones plasmáticas de anticuerpos, CRP y receptor de IL-6 soluble libre en macacos

Las concentraciones plasmáticas en macacos cangrejeros se determinaron por ELISA usando un método conocido para los expertos en la técnica.

- 5 La concentración de CRP se determinó con un analizador automático (TBA-120FR; Toshiba Medical Systems Co.) usando Cias R CRP (KANTO CHEMICAL CO., INC.).

- 10 La concentración plasmática del receptor de IL-6 de macaco cangrejero soluble libre en los macacos cangrejeros se determinó por el procedimiento descrito a continuación. Todos los anticuerpos IgG (IgG de macaco cangrejero, anticuerpo anti-receptor IL-6 humano y complejo de anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano-receptor de IL-6 de macaco cangrejero soluble) en el plasma se adsorbieron en proteína A cargando 30 µl de plasma de macaco cangrejero en una cantidad adecuada de resina rProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) secada en una copa de filtro de 0,22 µm (Millipore). Después, la disolución en la copa se centrifugó usando una centrífuga de alta velocidad para recoger la disolución que pasaba a través. La disolución que pasaba a través no contenía complejo de anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano-receptor de IL-6 de macaco cangrejero soluble unido a proteína A. Por lo tanto, la concentración del receptor de IL-6 soluble libre se puede determinar midiendo la concentración del receptor de IL-6 de macaco cangrejero soluble en la disolución que pasaba a través de la proteína A. La concentración del receptor de IL-6 de macaco cangrejero soluble se determinó usando un método conocido para los expertos en la técnica para medir la concentración de receptor de IL-6 humano soluble. El receptor de IL-6 de macaco cangrejero soluble (cIL-6R) preparado como se ha descrito antes se usó como una referencia.

- 20 Después, se calculó el porcentaje de neutralización del receptor de IL-6 soluble mediante la siguiente fórmula.

$$\frac{\text{Concentración de receptor de IL-6 soluble libre después de administración de anticuerpo}}{\text{Concentración de receptor de IL-6 soluble antes de administración de anticuerpo}} \times 100$$

Aplicabilidad industrial

- 25 La invención proporciona regiones constantes de anticuerpo adecuadas para productos farmacéuticos, cuyas propiedades fisicoquímicas (estabilidad y homogeneidad), inmunogenicidad, seguridad y farmacocinética se han mejorado por alteración de aminoácidos

Lista de secuencias

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Región constante de anticuerpo modificado

<130> S1417 EP S3

5 <140> EP 08 83 4649.9

<141> 2008-09-26

<150> JP 2007-250147

<151> 2007-09-26

<160> 58

10 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 1

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

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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

ES 2 566 957 T3

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 2

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

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

ES 2 566 957 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 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

<210> 3

ES 2 566 957 T3

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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 Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

5 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

ES 2 566 957 T3

180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 4

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 4

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

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

10

ES 2 566 957 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 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 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
 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala 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 Val 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

<210> 5
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 566 957 T3

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 5

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

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 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

ES 2 566 957 T3

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala 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 Val 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> 6

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 6

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

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

10

ES 2 566 957 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 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 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 Val 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

<210> 7

5 <211> 324

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

ES 2 566 957 T3

<400> 7

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

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 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

ES 2 566 957 T3

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 Val 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> 8

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 8

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

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

10

ES 2 566 957 T3

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys 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 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu 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
 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala 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 Val 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 Leu Gly Lys
 325

<210> 9

<211> 324

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

ES 2 566 957 T3

<400> 9

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

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 Ser Leu Gly Thr Lys 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 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
180 185 190

ES 2 566 957 T3

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala 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 Val 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 Leu

<210> 10

<211> 329

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 10

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

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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr

10

ES 2 566 957 T3

65		70		75		80									
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
		100						105					110		
Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
		115						120				125			
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
	130					135					140				
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
145					150					155					160
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
			165						170					175	
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
		180						185					190		
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
		195					200					205			
Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
	210					215					220				
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu
225				230						235					240
Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
			245						250					255	
Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn
			260					265					270		
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu
		275					280					285			
Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val
	290					295					300				
Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln
305					310					315					320
Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
					325										

<210> 11

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

ES 2 566 957 T3

<400> 11

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

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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
130 135 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
165 170 175

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

ES 2 566 957 T3

195 200 205

Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 275 280 285

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 290 295 300

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 12
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 12
 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

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

10

ES 2 566 957 T3

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
 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

ES 2 566 957 T3

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> 13

<211> 445

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 13

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

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

10

ES 2 566 957 T3

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 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 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

ES 2 566 957 T3

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 Gly Lys
 435 440 445

<210> 14

<211> 446

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 14

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
 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

10

ES 2 566 957 T3

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 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

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

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

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

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

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro

ES 2 566 957 T3

340

345

350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

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

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

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

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

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

<210> 15

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 15

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

10 <210> 16

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

ES 2 566 957 T3

<400> 16

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

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 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

ES 2 566 957 T3

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 Val 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 Gly Lys
435 440 445

<210> 17

<211> 446

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 17

ES 2 566 957 T3

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

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 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
210 215 220

ES 2 566 957 T3

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

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

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

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

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

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

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

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

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

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

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

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

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

<210> 18

<211> 445

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 18

ES 2 566 957 T3

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	
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	Glu	Ser	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	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

ES 2 566 957 T3

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 Gly Lys
435 440 445

<210> 19

<211> 443

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 19

ES 2 566 957 T3

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
 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 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

ES 2 566 957 T3

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 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala 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 Val 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

<210> 20

<211> 446

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 20

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

10

ES 2 566 957 T3

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
 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 Pro Val Ala Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

ES 2 566 957 T3

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

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

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

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

<210> 21

<211> 443

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 21

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

10

ES 2 566 957 T3

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
 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 Lys 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

ES 2 566 957 T3

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

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

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala 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 Val 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 Leu
435 440

<210> 22

<211> 443

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 22

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

10

ES 2 566 957 T3

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

ES 2 566 957 T3

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 Val 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

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 23

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

10 <210> 24

<211> 267

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr His Leu Thr Ala Val Ser Ser
1 5 10 15

Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro

15

ES 2 566 957 T3

20	25	30
Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys		
35	40	45
Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu		
50	55	60
Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys		
65	70	75 80
Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys		
	85 90	95
Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu		
	100 105	110
Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly		
	115 120	125
Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln		
	130 135	140
Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro		
	145 150	155 160
His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp		
	165 170	175
Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly		
	180 185	190
Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu		
	195 200	205
Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly		
	210 215	220
Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser Phe His Ala Ser Ser Ser Leu		
	225 230	235 240
Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His Tyr Cys Cys Ile Val Gln His		
	245 250	255
Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val Glu Leu		
	260 265	

<210> 25

<211> 99

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 25

ES 2 566 957 T3

Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu
1 5 10 15

Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro
20 25 30

Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys
35 40 45

Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu
50 55 60

Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys
65 70 75 80

Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp
85 90 95

Arg Asp Met

<210> 26

<211> 443

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 26

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

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

10

ES 2 566 957 T3

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 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

ES 2 566 957 T3

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
 <210> 27
 <211> 449
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial
 <400> 27
 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
 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

ES 2 566 957 T3

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

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

ES 2 566 957 T3

340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr	355	360
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu	370	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu	385	390
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys	405	410
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu	420	425
Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly	435	440
		445

Lys

<210> 28

$\langle 211 \rangle$ 443

<212> PRT

5 <213> Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 28

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

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

ES 2 566 957 T3

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 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

ES 2 566 957 T3

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
 <210> 29
 <211> 119
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus
 <400> 29
 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
 Gln Asp 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 Leu Leu Ala Arg Ala Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Ile Leu Val Thr Val Ser Ser

115

10 <210> 30
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

ES 2 566 957 T3

<400> 30

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 Glu 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 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

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

<210> 31

<211> 120

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

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

Ile Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Asp Gly Pro Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

10

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

15 <400> 32

ES 2 566 957 T3

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 Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Phe
20 25 30

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

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Lys Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Glu Ser Pro Leu
85 90 95

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

<210> 33

<211> 122

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 33

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ser Gly Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe 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 Lys Asp Pro Gly Thr Thr Val Ile Met Ser Trp Phe Asp Pro Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 34

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

ES 2 566 957 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Gly Arg
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

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

<210> 35

<211> 324

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 35

ES 2 566 957 T3

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

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

ES 2 566 957 T3

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

<210> 36

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 36

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

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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

10

ES 2 566 957 T3

100	105	110		
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	115	120	125	
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	130	135	140	
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	165	170	175	
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	180	185	190	
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	195	200	205	
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	210	215	220	
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu	225	230	235	240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	245	250	255	
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	260	265	270	
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	275	280	285	
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	290	295	300	
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr	305	310	315	320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	325	330		

<210> 37

<211> 324

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 37

ES 2 566 957 T3

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

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

50127

ES 2 566 957 T3

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

<210> 38

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 38

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
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 Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

10

ES 2 566 957 T3

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

<210> 39

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 39

ES 2 566 957 T3

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	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	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

ES 2 566 957 T3

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

<210> 40

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 40

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 Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

10

ES 2 566 957 T3

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

<210> 41

<211> 445

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial <400> 41

ES 2 566 957 T3

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
 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 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 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

ES 2 566 957 T3

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 Gly Lys
435 440 445

<210> 42

<211> 445

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 42

ES 2 566 957 T3

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
 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 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 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 Ser 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

ES 2 566 957 T3

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 Gly Lys
435 440 445

<210> 43

<211> 328

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 43

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

10

ES 2 566 957 T3

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
 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

ES 2 566 957 T3

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 44

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 44

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 Val 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 Asp 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 Leu Leu Ala Arg Ala Thr Ala Met Asp Val 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

10

ES 2 566 957 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
 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 Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

<210> 45
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 45
 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 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
 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

10

<210> 46
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

ES 2 566 957 T3

<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 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

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

ES 2 566 957 T3

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			

<210> 47
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 47

```

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

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
    
```

10

<210> 48
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 48

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

ES 2 566 957 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 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 2 566 957 T3

<210> 49
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 49
 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
 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

10

<210> 50
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

ES 2 566 957 T3

<400> 50

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

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

ES 2 566 957 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 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 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 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala 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 Gly Lys
 435 440 445

<210> 51
 <211> 443
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 51

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

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

5

ES 2 566 957 T3

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 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 Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala 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

<210> 52

5 <211> 445

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

ES 2 566 957 T3

<400> 52

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

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

ES 2 566 957 T3

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 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 Gly Lys
435 440 445

<210> 53

<211> 443

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 53

ES 2 566 957 T3

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
 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205

ES 2 566 957 T3

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 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

<210> 54

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 54

ES 2 566 957 T3

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

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 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

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

ES 2 566 957 T3

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

<210> 55

<211> 324

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 55

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

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

10

ES 2 566 957 T3

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 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

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala 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> 56

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 56

ES 2 566 957 T3

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

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 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

ES 2 566 957 T3

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

<210> 57

<211> 324

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 57

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

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

10

ES 2 566 957 T3

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
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
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
Ser Leu Ser Pro		

<210> 58

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de péptido sintetizada artificial

<400> 58

ES 2 566 957 T3

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
 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

ES 2 566 957 T3

225		230		235		240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			245			
				Lys	Pro	Lys
				250	Asp	Thr
						Leu
						Met
						Ile
						Ser
						255
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			260			Val
						Val
						Val
						Asp
						Val
						Ser
						His
						Glu
						Asp
						270
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
			275			Tyr
						Val
						Asp
						Gly
						Val
						Glu
						Val
						His
						Asn
						285
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
						Glu
						Gln
						Tyr
						Asn
						Ser
						Thr
						Tyr
						Arg
						Val
						290
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
						His
						Gln
						Asp
						Trp
						Leu
						Asn
						Gly
						Lys
						Glu
						305
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
						Lys
						Ala
						Leu
						Pro
						Ala
						Pro
						Ile
						Glu
						Lys
						325
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
						Gln
						Pro
						Arg
						Glu
						Pro
						Gln
						Val
						Tyr
						Thr
						340
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
						Leu
						Thr
						Lys
						Asn
						Gln
						Val
						Ser
						Leu
						Thr
						355
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
						Pro
						Ser
						Asp
						Ile
						Ala
						Val
						Glu
						Trp
						Glu
						370
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
						Asn
						Tyr
						Lys
						Thr
						Thr
						Pro
						Pro
						Val
						Leu
						385
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
						Leu
						Tyr
						Ser
						Lys
						Leu
						Thr
						Val
						Asp
						Lys
						405
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
						Val
						Phe
						Ser
						Cys
						Ser
						Val
						Met
						His
						Glu
						420
Ala	Leu	His	Ala	His	Tyr	Thr
						Gln
						Lys
						Ser
						Leu
						Ser
						Leu
						Ser
						Pro
						435
						440
						445

REIVINDICACIONES

1. Una región constante de anticuerpo humano de una cualquiera de:

(a) una región constante de anticuerpo humano que comprende eliminaciones tanto de Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración EU) como de Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y

(b) una región constante de anticuerpo humano que comprende eliminaciones tanto de Gly en la posición 326 (posición 446 en el sistema de numeración EU) como de Lys en la posición 327 (posición 447 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

2. La región constante de anticuerpo de la reivindicación 1 (a), en la que los aminoácidos en las posiciones 209 (posición 330 en el sistema de numeración EU), 210 (posición 331 en el sistema de numeración EU), 218 (posición 339 en el sistema de numeración EU), 276 (posición 397 en el sistema de numeración EU), 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), y 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se han sustituido por otros aminoácidos.

3. La región constante de anticuerpo de la reivindicación 1 (a), en la que los aminoácidos en las posiciones 276 (posición 397 en el sistema de numeración EU), 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), y 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se han sustituido por otros aminoácidos.

4. La región constante de anticuerpo de la reivindicación 1 (a), en la que la Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU), His en la posición 147 (posición 268 en el sistema de numeración EU), Arg en la posición 234 (posición 355 en el sistema de numeración EU), y Gln en la posición 298 (posición 419 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se han sustituido por otros aminoácidos.

5. La región constante de anticuerpo de la reivindicación 1 (a), en la que la Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU), His en la posición 147 (posición 268 en el sistema de numeración EU), Arg en la posición 234 (posición 355 en el sistema de numeración EU), Gln en la posición 298 (posición 419 en el sistema de numeración EU), y Asn en la posición 313 (posición 434 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se han sustituido por otros aminoácidos.

6. La región constante de anticuerpo de la reivindicación 1 (b), en la que los aminoácidos en la posición 289 (posición 409 en el sistema de numeración EU), posiciones 14, 16, 20, 21, 97, 100, 102, 103, 104 y 105 (posiciones 131, 133, 137, 138, 214, 217, 219, 220, 221 y 222 en el sistema de numeración EU, respectivamente), y posiciones 113, 114 y 115 (posiciones 233, 234 y 235 en el sistema de numeración EU, respectivamente), se han sustituido por otros aminoácidos, y el aminoácido en la posición 116 (posición 236 en el sistema de numeración EU) se ha eliminado de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

7. La región constante de anticuerpo de la reivindicación 1 (a), en la que la Ala en la posición 209 (posición 330 en el sistema de numeración EU), Pro en la posición 210 (posición 331 en el sistema de numeración EU), Thr en la posición 218 (posición 339 en el sistema de numeración EU), Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), y Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se han sustituido por otros aminoácidos.

8. La región constante de anticuerpo de la reivindicación 1 (a), en la que la Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración EU), Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración EU), Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración EU), y Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se han sustituido por otros aminoácidos.

9. Una región constante de anticuerpo humano de la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 57 (M40ΔGK) o SEQ ID NO: 55 (M86ΔGK).

10. Un anticuerpo, un anticuerpo anti-receptor de IL-6 o una composición farmacéutica que comprende la región

constante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

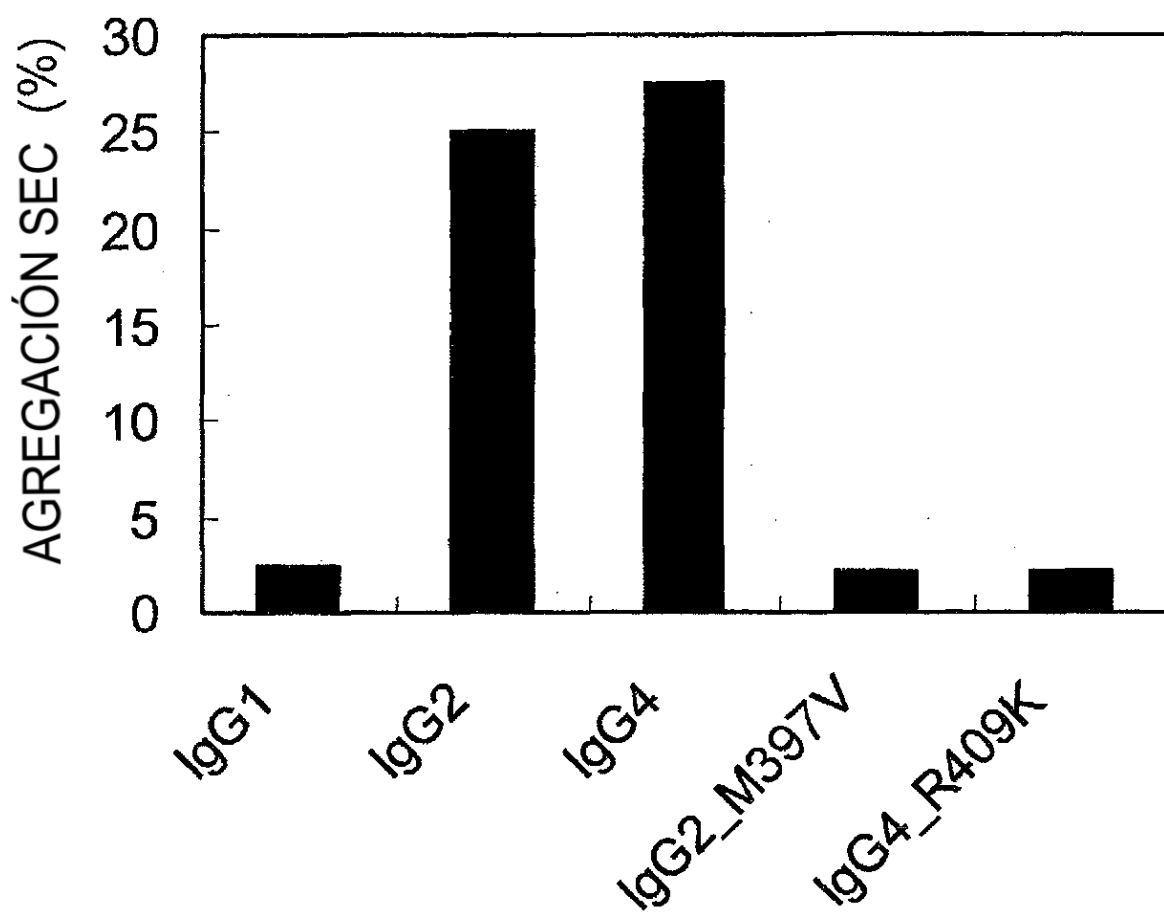


FIG. 1

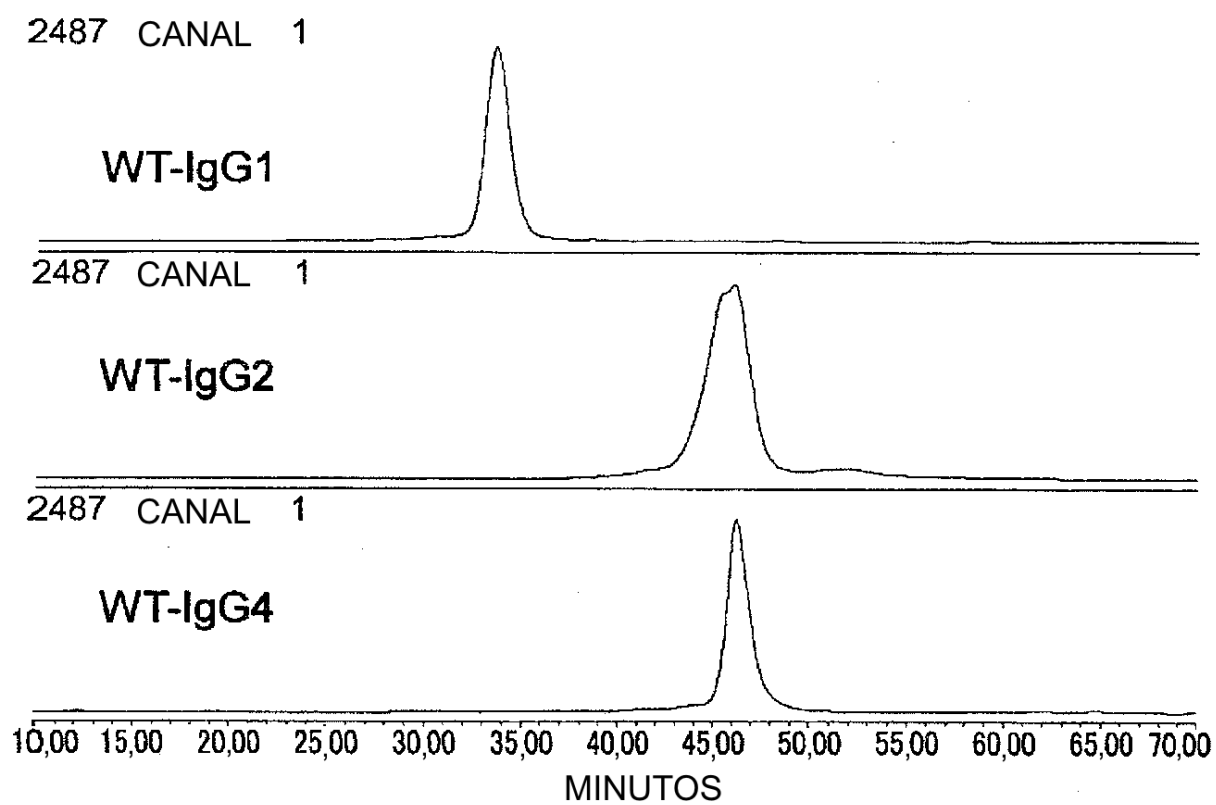


FIG. 2

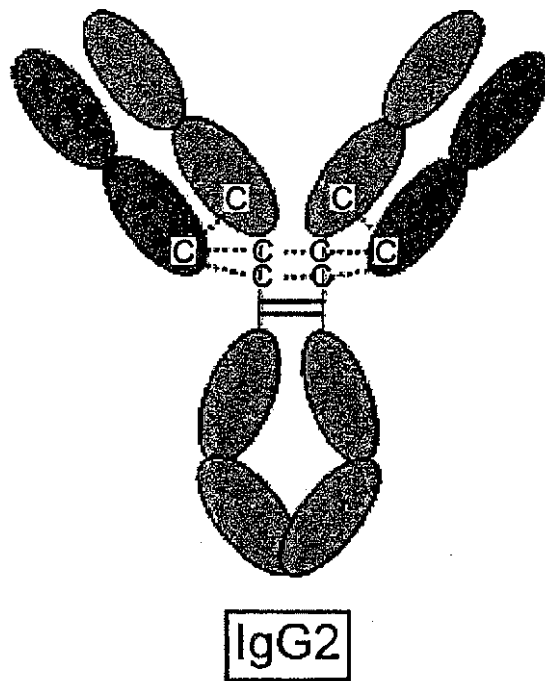


FIG. 3

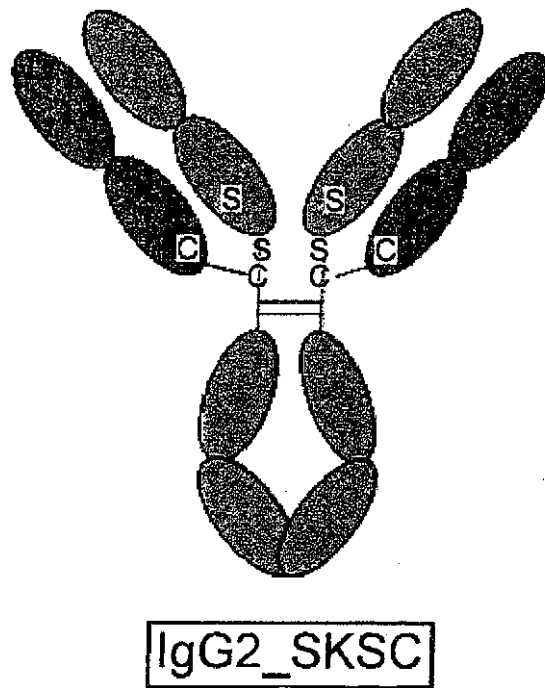


FIG. 4

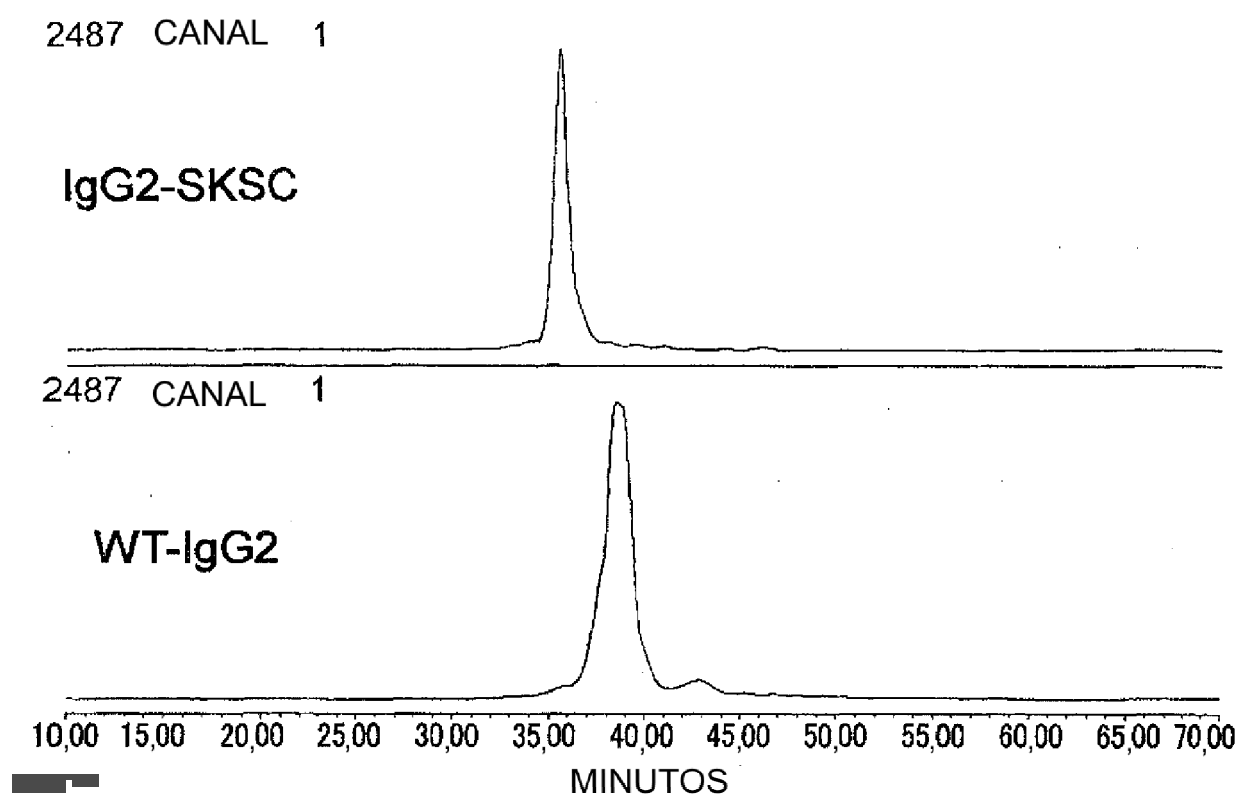


FIG. 5

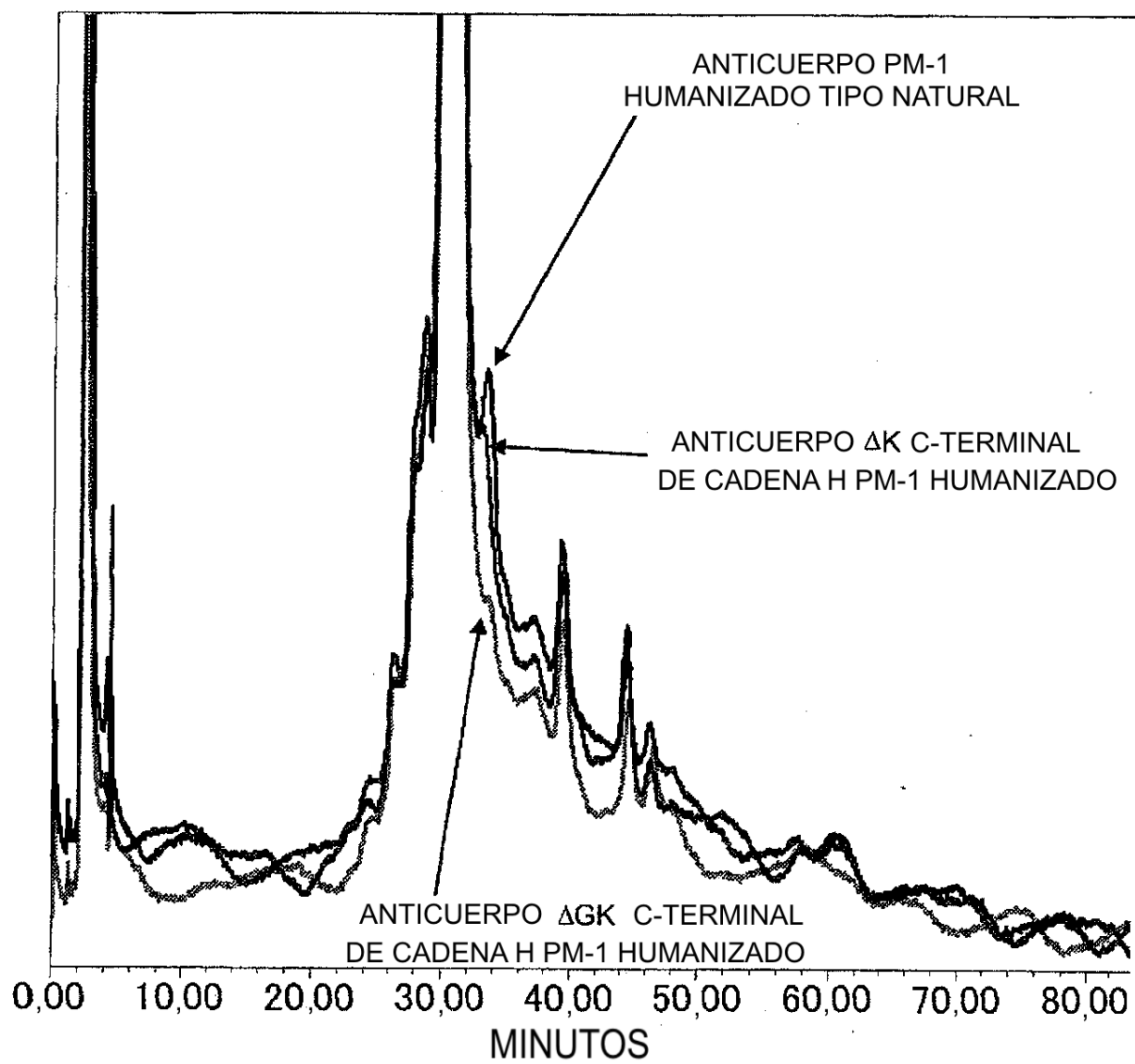
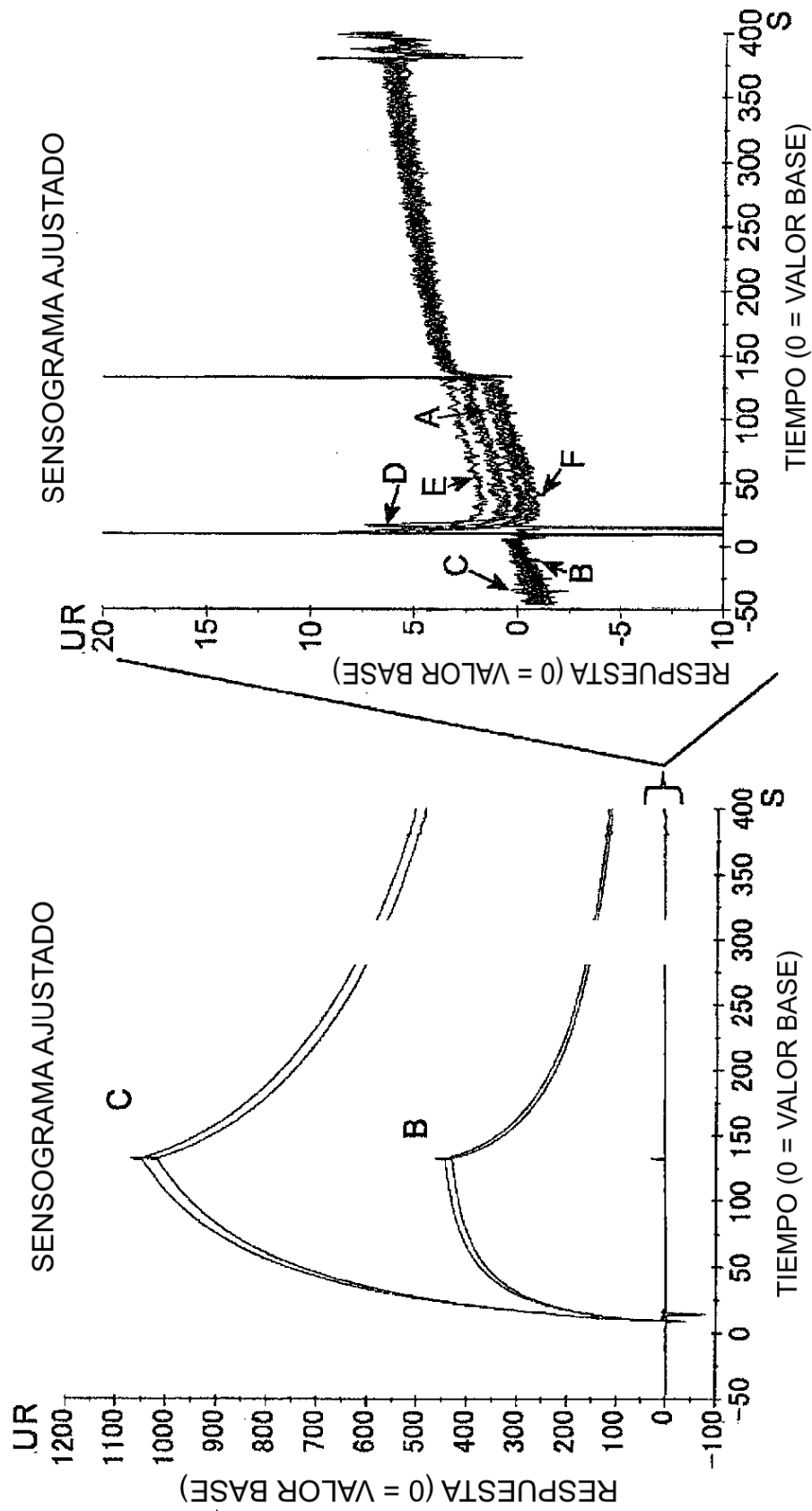


FIG. 6



A: M14ΔGK B: IgG4 C: IgG1 D: M11ΔGK E: IgG2 F: M17ΔGK

FIG. 7

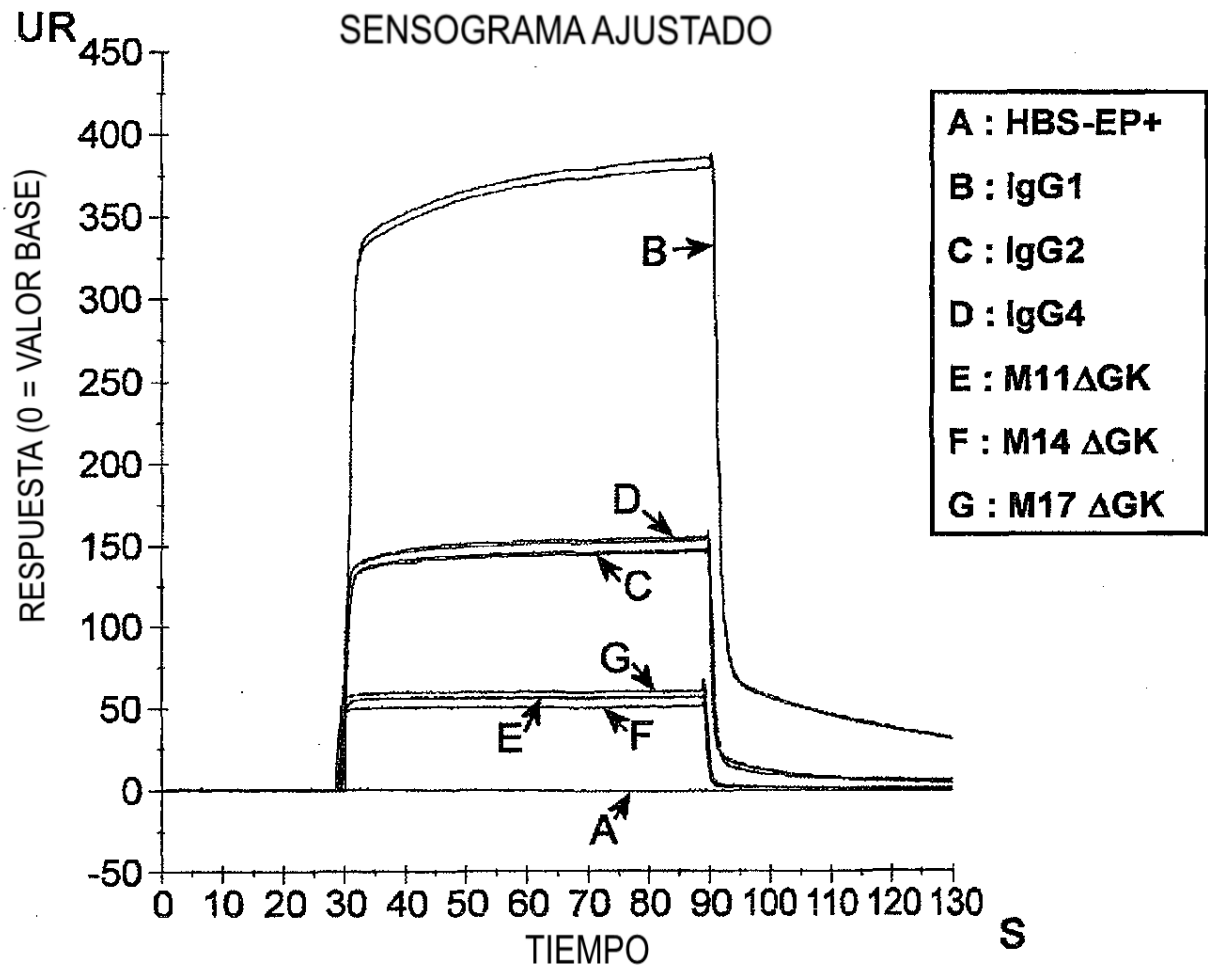


FIG. 8

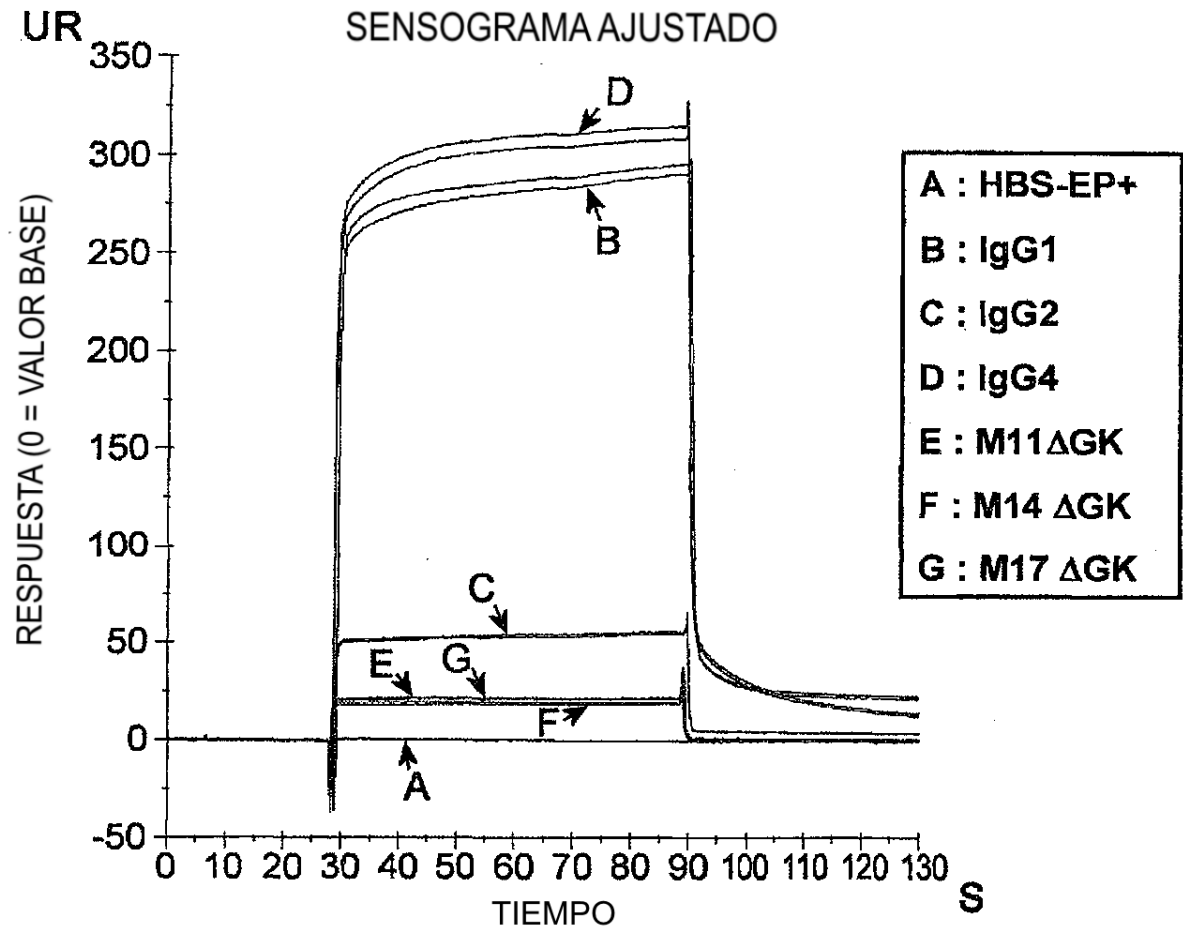


FIG. 9

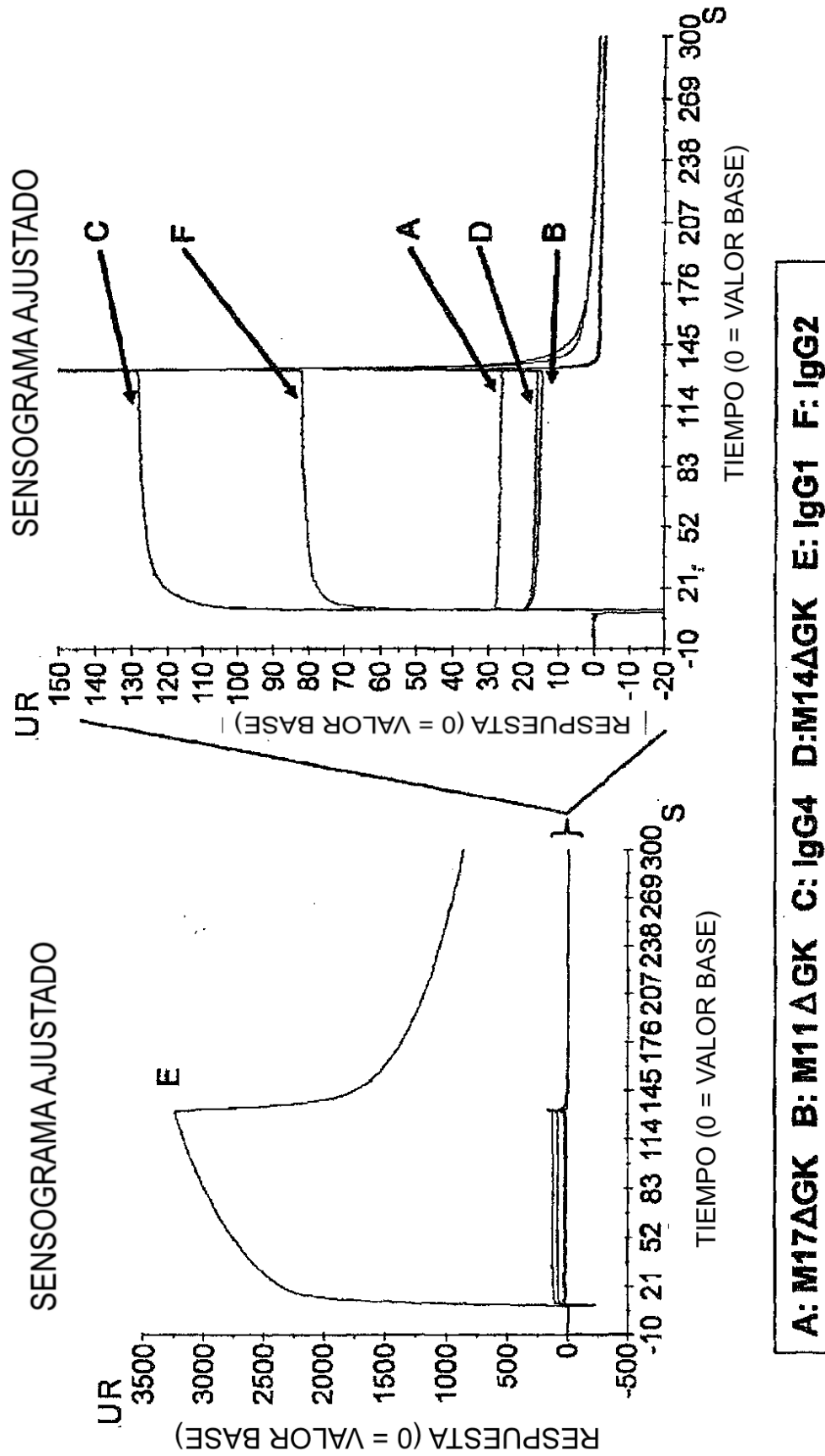


FIG. 10

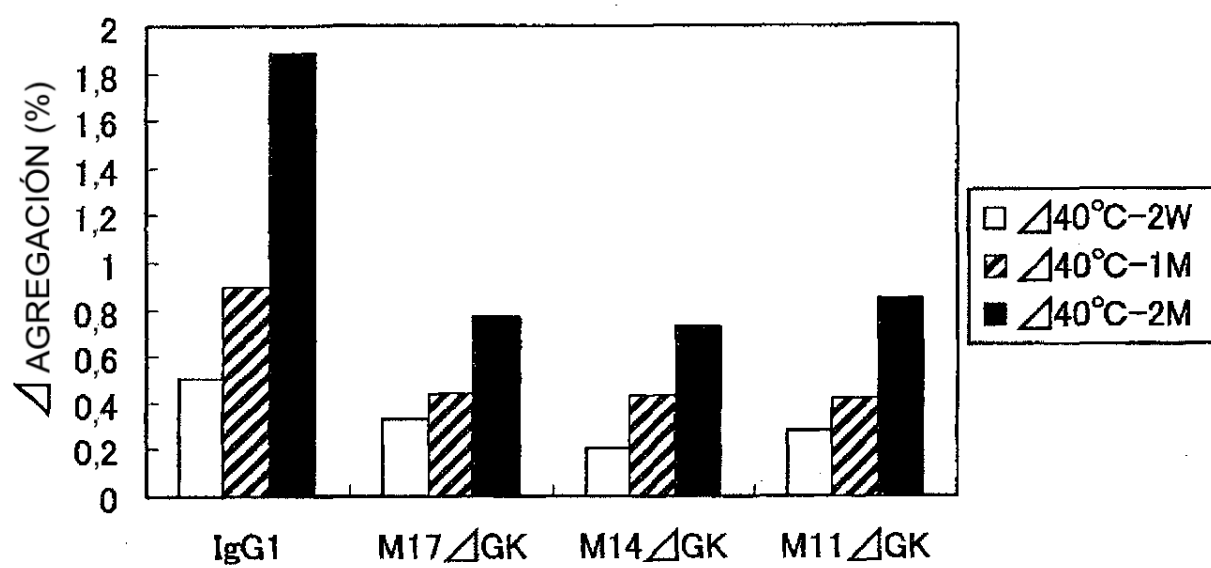


FIG. 11

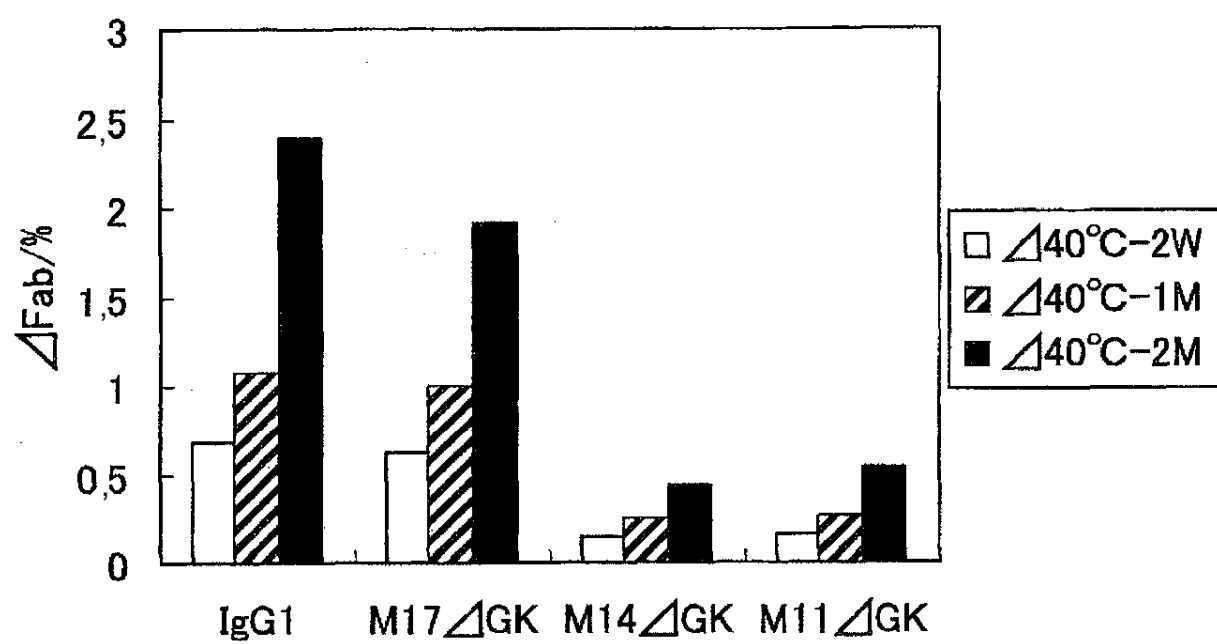


FIG. 12

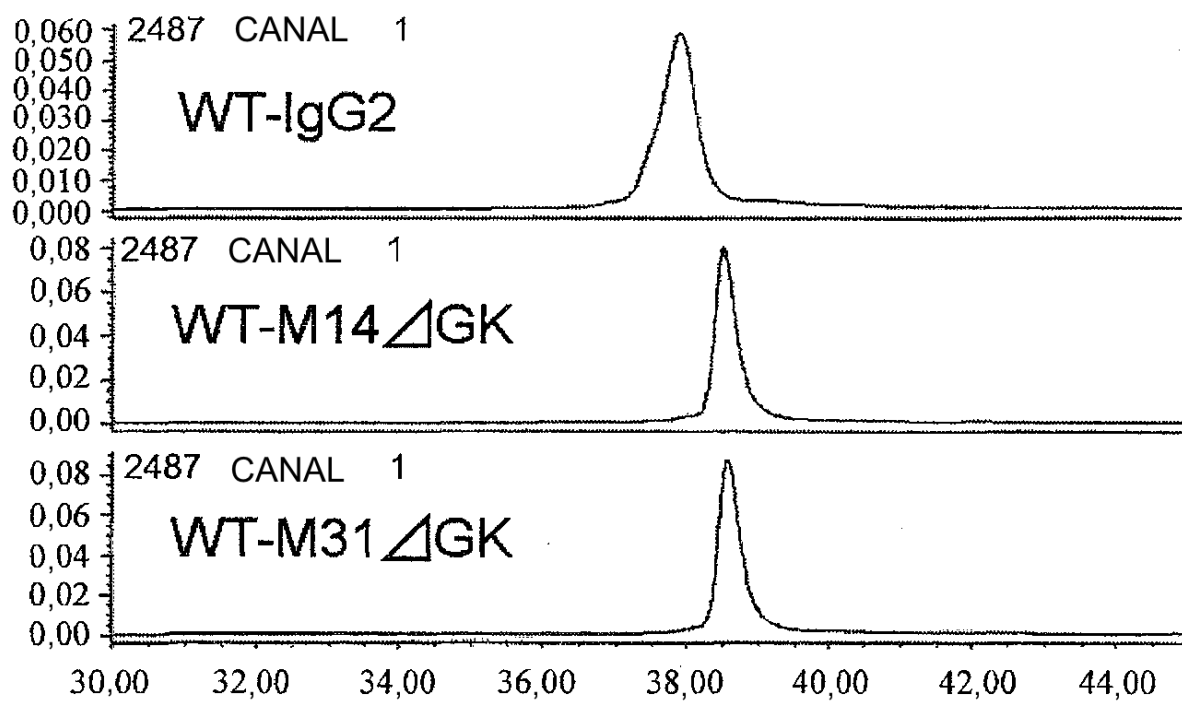


FIG. 13

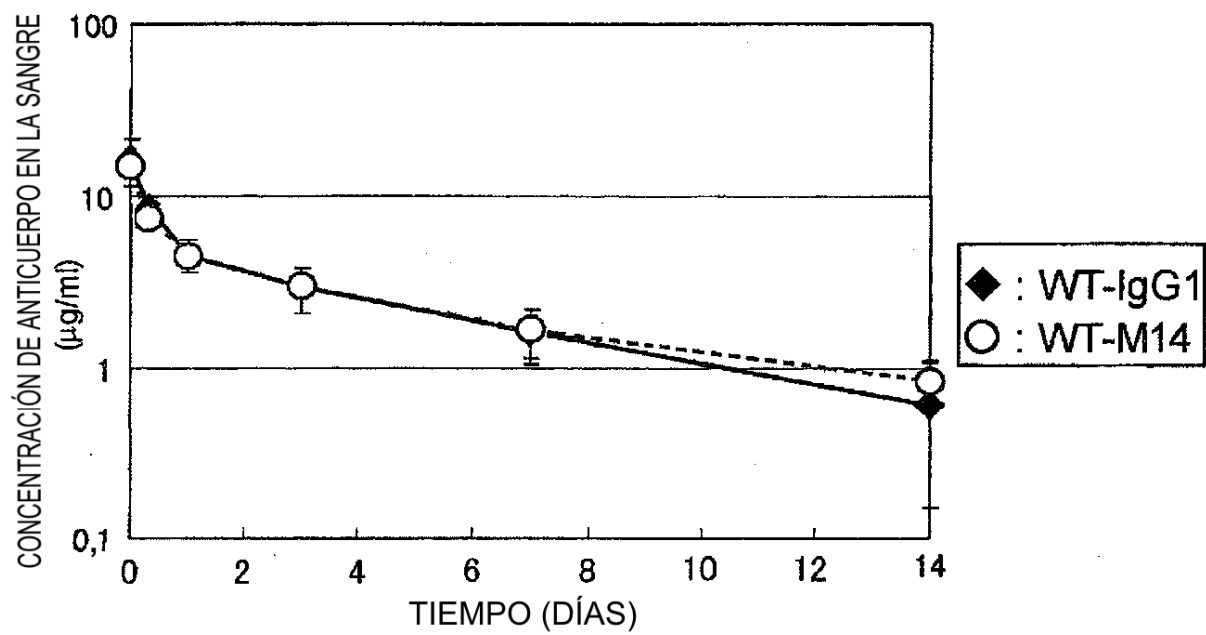


FIG. 14

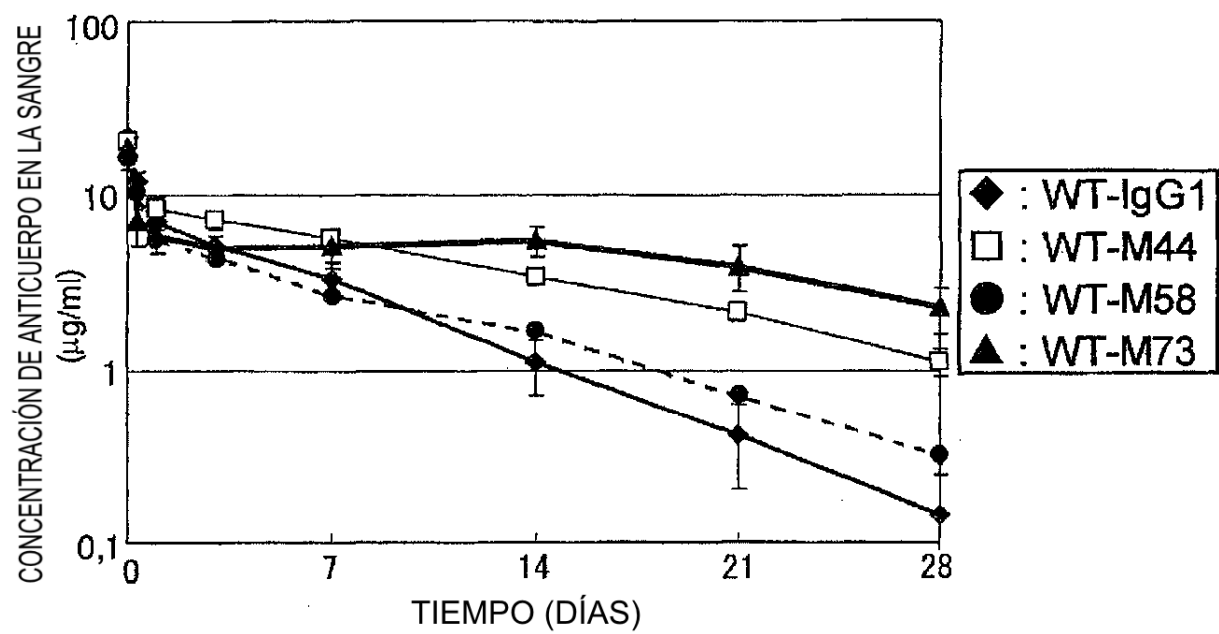


FIG. 15

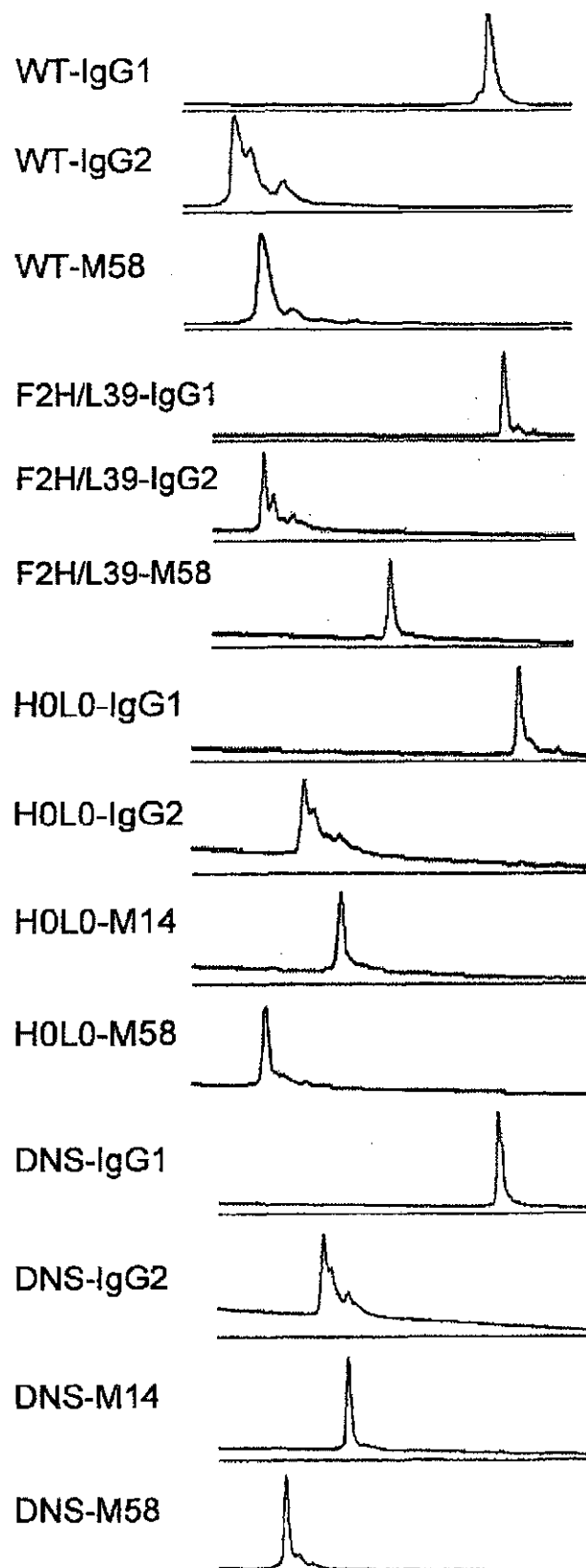


FIG. 16

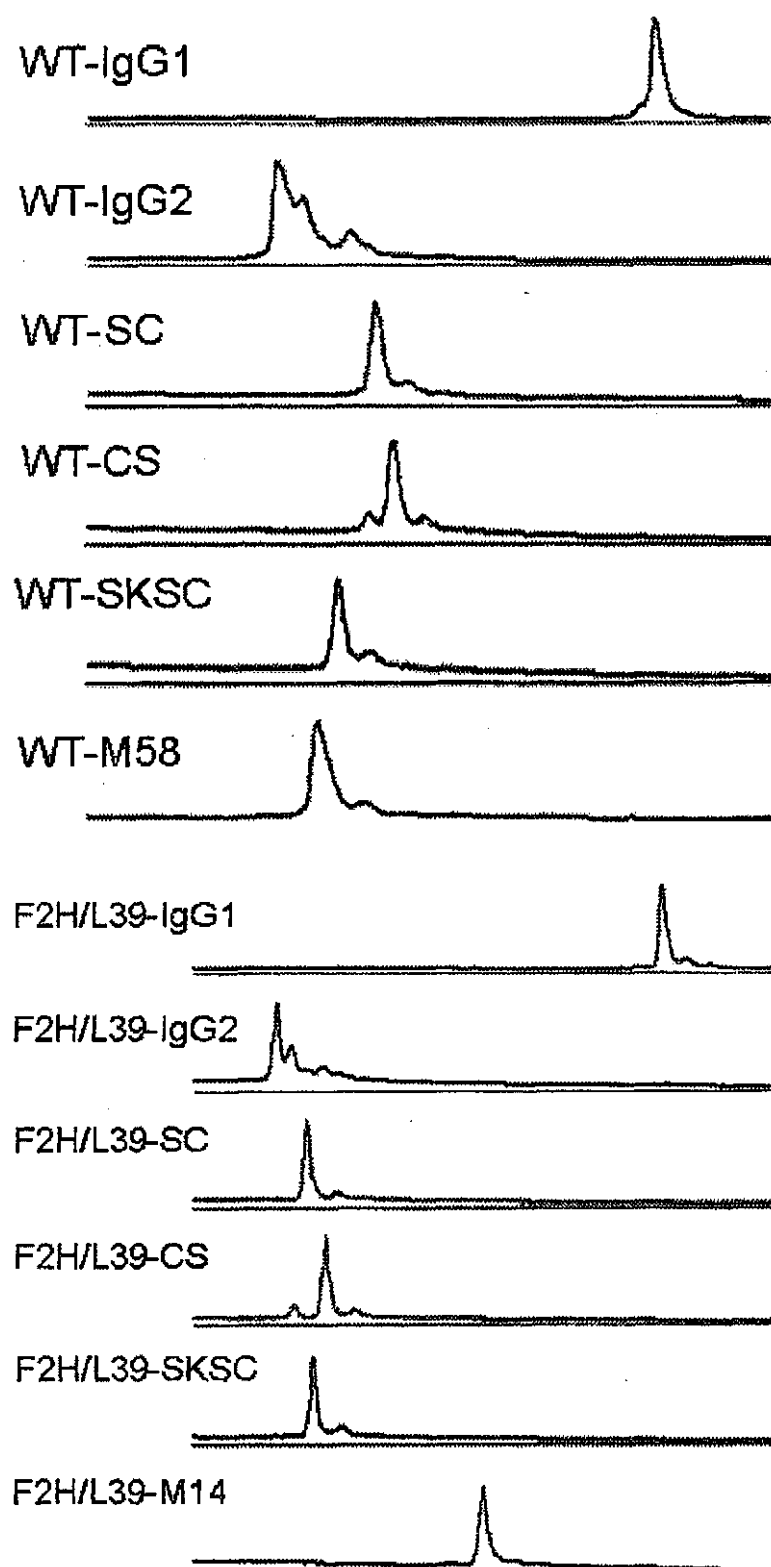


FIG. 17

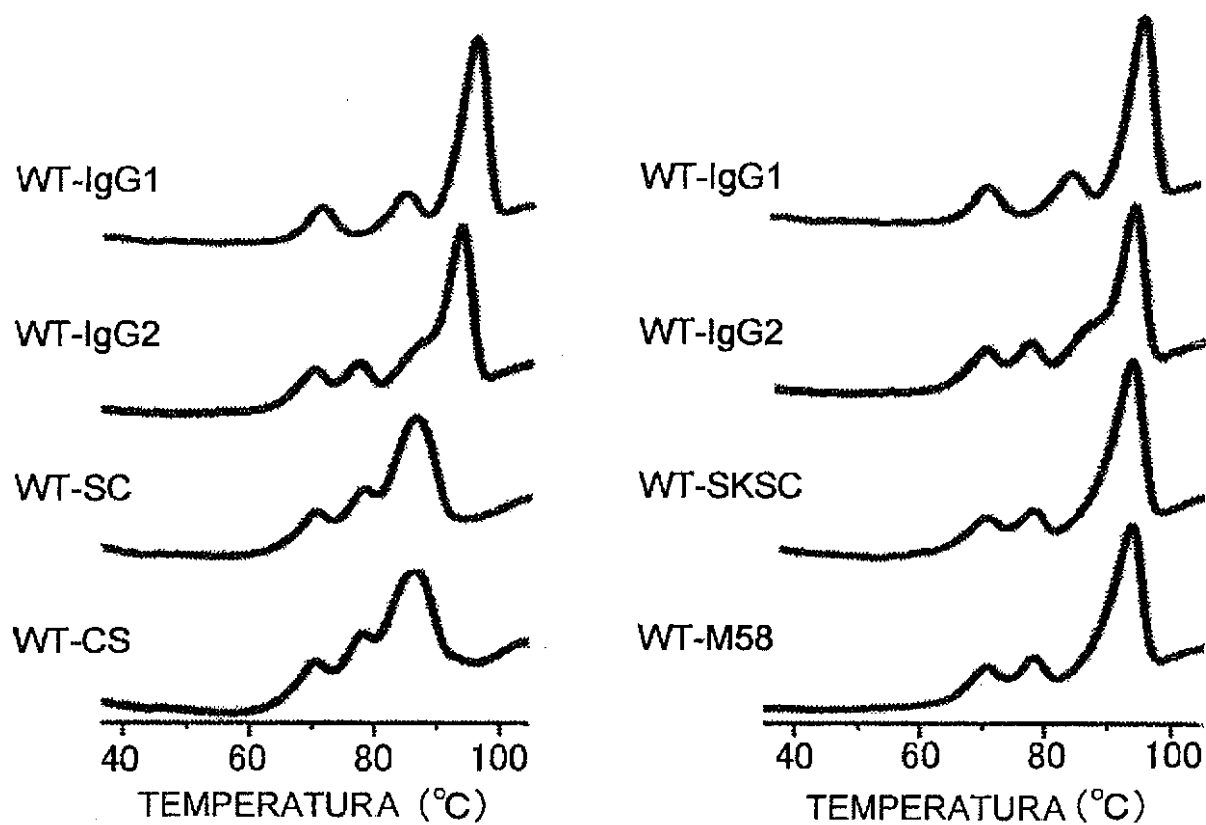


FIG. 18

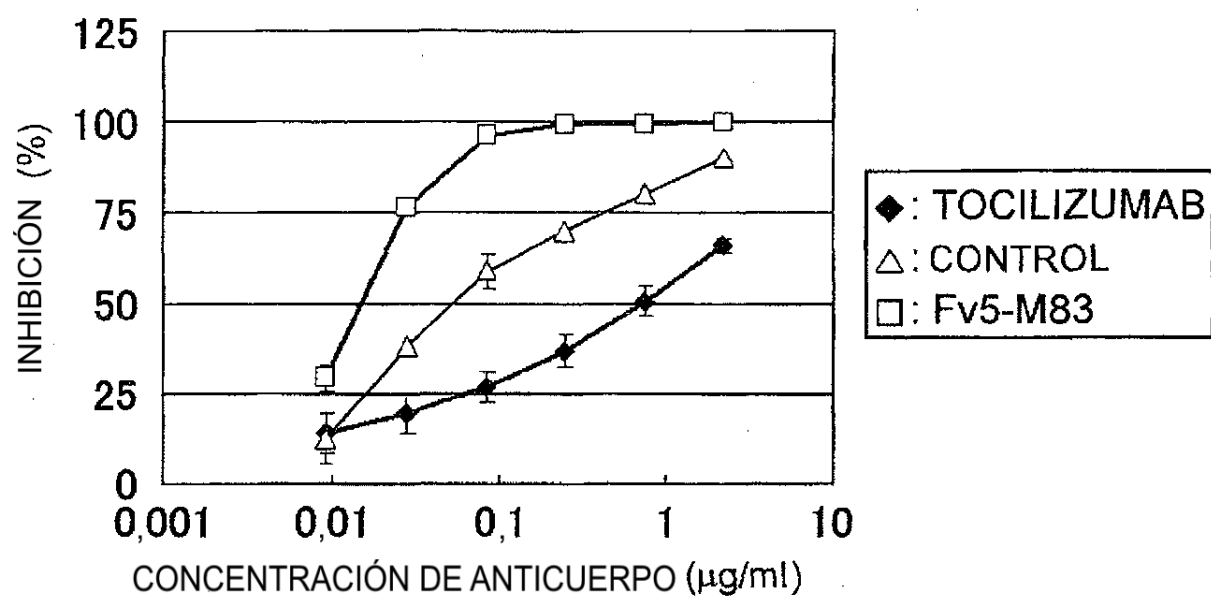


FIG. 19

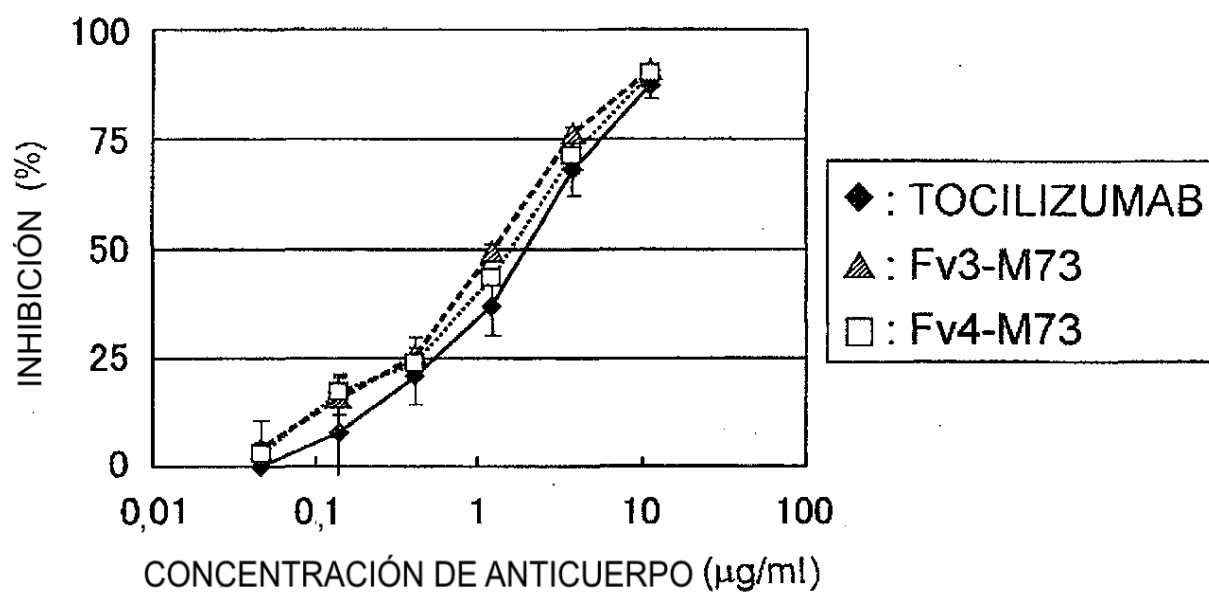


FIG. 20

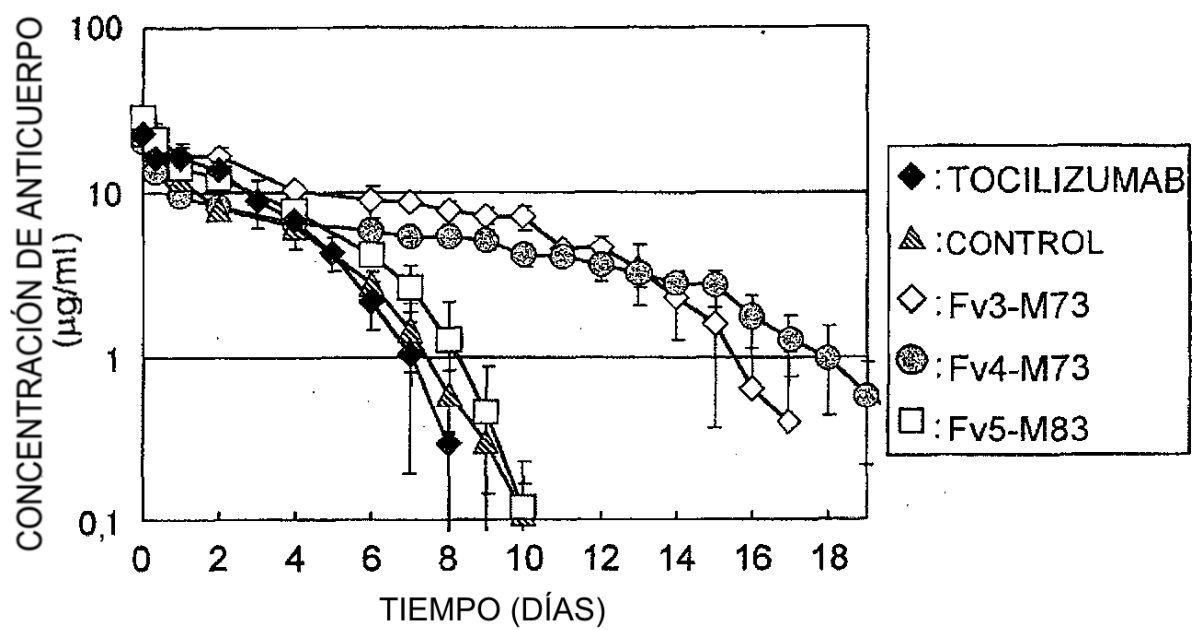


FIG. 21

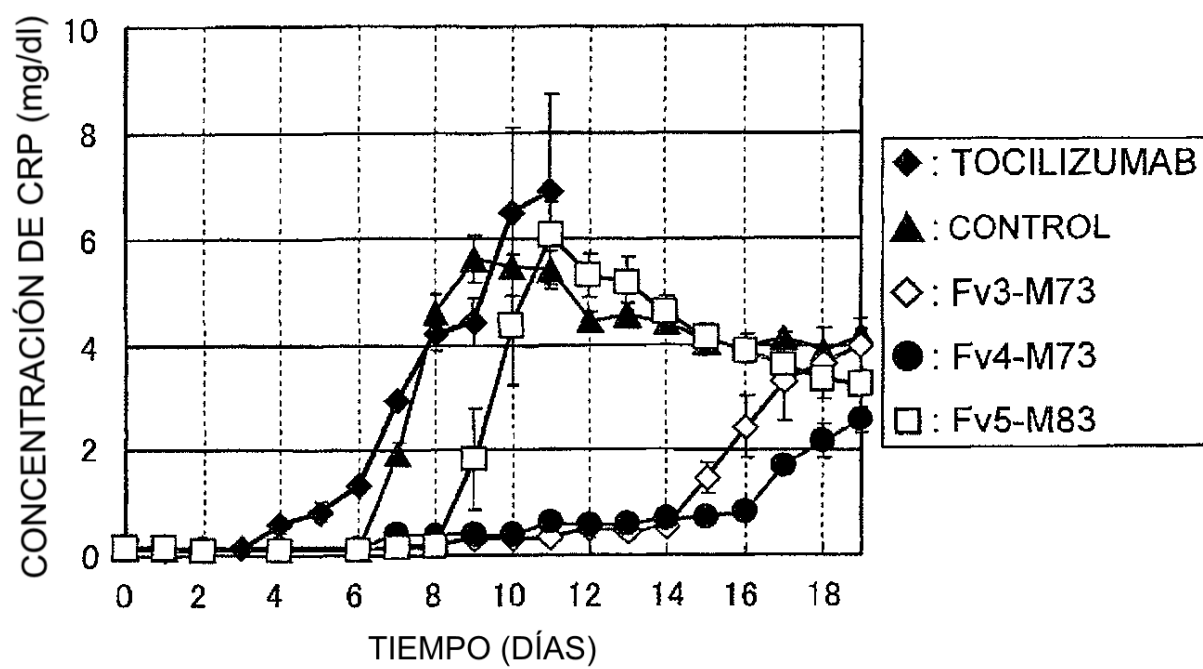


FIG. 22

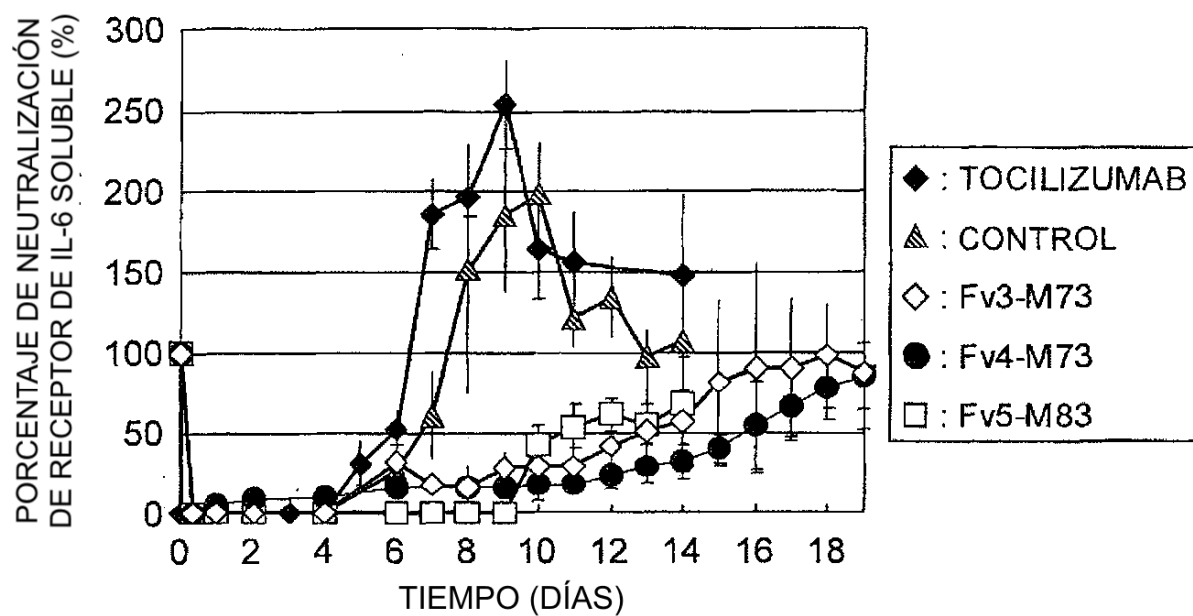


FIG. 23

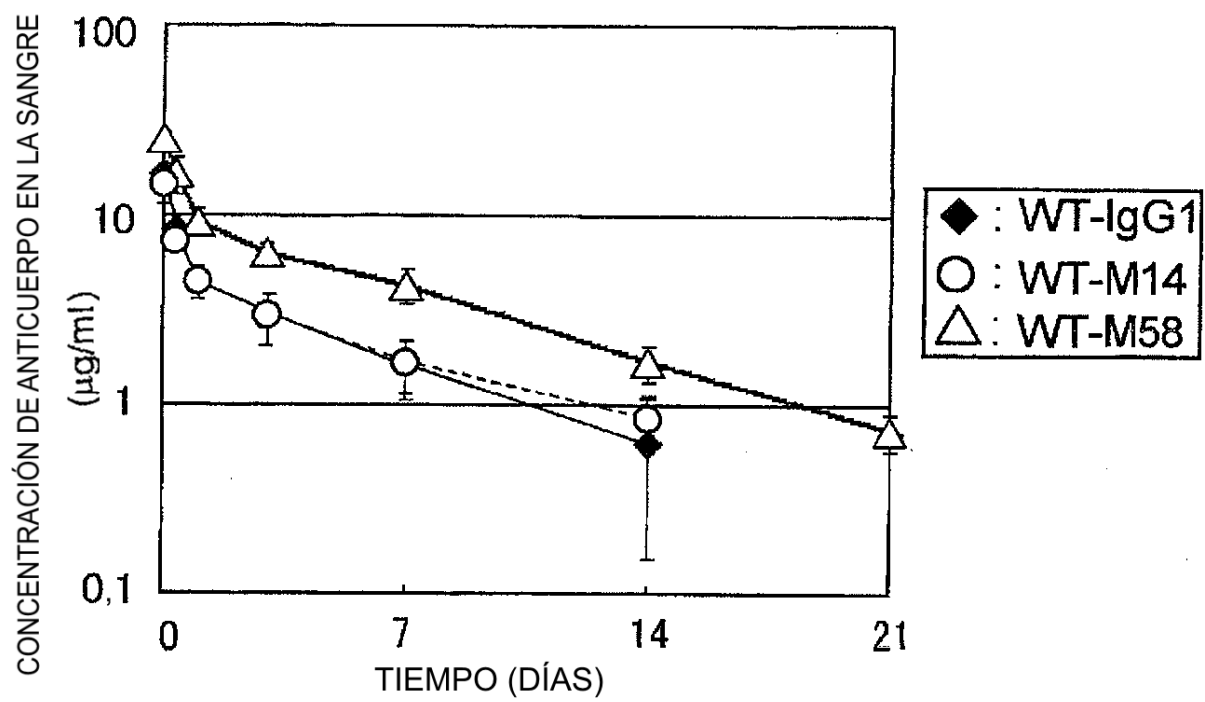


FIG. 24