

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 271**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2006 PCT/JP2006/306803**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.10.2006 WO06106905**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2006 E 06730751 (2)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 1870459**

54 Título: **Métodos de producción de polipéptidos mediante la regulación de la asociación de los polipéptidos**

30 Prioridad:

31.03.2005 JP 2005101105
28.12.2005 JP 2005378266

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.11.2016

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
TSUNODA, HIROYUKI

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 592 271 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

Métodos de producción de polipéptidos mediante la regulación de la asociación de los polipéptidos

5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere, en general, a métodos de producción de polipéptidos mediante la regulación de la asociación intramolecular o intermolecular de cada molécula, y a polipéptidos cuya asociación intramolecular o intermolecular se regula. La presente invención se refiere a métodos de producción de uno de los isómeros conformacionales de un anticuerpo sc(Fv)₂ que comprende una sustitución en un resto de aminoácido de la superficie de contacto del anticuerpo sc(Fv)₂, que está formado por la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo, de modo que se regulará la asociación del polipéptido en el anticuerpo sc(Fv)₂ para obtener de manera eficaz uno de los isómeros conformacionales de un anticuerpo sc(Fv)₂, comprendiendo el método las etapas de:

- (a) modificar un ácido nucleico, que codifica un resto de aminoácido que forma la superficie de contacto del polipéptido, del ácido nucleico original, de modo que se inhiba la asociación del polipéptido que forma uno de los isómeros conformacionales en un anticuerpo sc(Fv)₂ que puede formar dos tipos de isómeros conformacionales;
- (b) cultivar células hospedadoras de modo que se exprese una secuencia de ácido nucleico modificada mediante la etapa (a); y
- (c) recuperar del cultivo de células hospedadoras dicho isómero conformacional de dicho anticuerpo sc(Fv)₂

en el que la modificación de la etapa (a) consiste en modificar el ácido nucleico original de manera que se sustituyan uno o más restos de aminoácidos en la superficie de contacto de modo que dos o más restos de aminoácidos, incluyendo el/los resto/s mutado/s, que forman la superficie de contacto, porten el mismo tipo de carga positiva o negativa. Mediante dichos métodos, se puede obtener un isómero conformacional de un anticuerpo sc(Fv)₂. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un isómero conformacional de un anticuerpo sc(Fv)₂ que se puede obtener mediante el método de la presente invención y a composiciones farmacéuticas que, como principio activo, contienen dicho isómero conformacional de un anticuerpo sc(Fv)₂.

Antecedentes de la técnica

Debido a su naturaleza altamente estable en la sangre y a sus relativamente escasos efectos secundarios, los anticuerpos han sido objeto de mucha atención como productos farmacéuticos. Son de particular interés los anticuerpos biespecíficos, que pueden reconocer simultáneamente dos tipos de antígenos. MDX-210, que actualmente se está investigando en ensayos clínicos, es un anticuerpo biespecífico de tipo IgG que se vuelve a dirigir a los monocitos que expresan FcγRI y a las células cancerosas que expresan HER-2/neu (véase el Documento no de patente 1). En general, los anticuerpos se producen usando técnicas de recombinación genética. Una técnica específica implica la clonación de un ADN que codifica una proteína de anticuerpo de células productoras de anticuerpos, tales como hibridomas o linfocitos sensibilizados que producen anticuerpos o una fagoteca que presenta genes de anticuerpos, y su inserción en un vector adecuado, que después se transfecta en las células hospedadoras para la producción de anticuerpos. La producción de anticuerpos biespecíficos de tipo IgG usando técnicas de recombinación genética, implica la introducción en las células de un total de cuatro tipos de genes, constituyendo estos genes de cadenas H y cadenas L dos tipos de IgG de interés, y la secreción de los anticuerpos por coexpresión. En este tipo de sistema, la expresión de las cadenas H y de las cadenas L de tipo silvestre que constituyen los genes conduce a la unión covalente aleatoria entre dos tipos de cadenas H y la unión no covalente entre las cadenas H y L, y por lo tanto, la proporción del anticuerpo biespecífico de interés se reduce mucho. Más concretamente, solo uno de los diez tipos producidos es el anticuerpo biespecífico de interés, haciendo que la eficacia de la producción sea bastante baja. La reducción de la eficacia de la producción del anticuerpo de interés no solo es un obstáculo para purificar el anticuerpo de interés, sino que también aumenta la falta de uniformidad, tal como las diferencias de un lote a otro, lo que, a su vez, conduce a aumentar los costes de producción.

Se ha informado de la secreción preferencial de las IgG con una combinación heteróloga de cadenas H mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos en la región CH₃ de la cadena H de IgG como medio para mejorar la eficacia de la producción de anticuerpos biespecíficos (véase el Documento de patente 1 y los Documentos no de patente 2 y 3). Este método implica inducir la promoción de la formación de la cadena H heteróloga y la inhibición de la formación de la cadena H homogénea mediante la sustitución de una cadena de aminoácidos lateral presente en la región CH₃ de una de las cadenas H con una cadena lateral más larga (botón), y la sustitución de la cadena de aminoácidos lateral presente en la región CH₃ de la otra cadena H con una cadena lateral más corta (ojal), de manera que el botón se sitúe en el ojal. También se ha informado de un hallazgo que usa un "botón" y un "ojal" similares en la superficie de contacto en la que la región variable de la cadena H (denominada en lo sucesivo en el presente documento VH) se asocia con la región variable de la cadena L (denominada en lo sucesivo en el presente documento VL) (véase el Documento no de patente 4). De acuerdo con el informe de Zhu *et al.*, la sustitución de dos tipos de aminoácidos presentes en la superficie de contacto VH-VL (cuatro tipos para ambas cadenas) potencia la formación de la molécula heteróloga con una eficacia 1,28 veces superior (tipo silvestre: 72 % y tipo modificado:

92 %). Mientras tanto, la sustitución de un tipo de aminoácido (dos tipos para ambas cadenas) da lugar al mismo nivel de eficacia que el del tipo silvestre. Sin embargo, el método de establecimiento de un botón y un ojal en VH y VL no basta para potenciar la formación de moléculas heterólogas.

- 5 [Documento de patente 1] Publicación internacional WO 96/27011.
 [Documento no de patente 1] Segal D. M. *et al.*, *Current Opinion in Immunology*, 1999, vol. 11, pág. 558-562.
 [Documento no de patente 2] Ridgway J. B. *et al.*, *Protein Engineering*, 1996, vol. 9, pág. 617-621.
 [Documento no de patente 3] Merchant A. M. *et al.*, *Nature Biotechnology*, 1998, vol. 16, pág. 677-681.
 [Documento no de patente 4] Zhe Z. *et al.*, *Protein Science*, 1997, vol. 6, pág. 781-788.

10

Divulgación de la invención

Problemas a resolver mediante la presente invención

- 15 La presente invención se realizó a la vista de las circunstancias anteriores. Un objetivo de la presente divulgación es proporcionar un método de regulación de la asociación de polipéptidos, polipéptidos cuya asociación se regula y métodos de producción de dichos polipéptidos. En una realización, es un objetivo proporcionar métodos para producir eficazmente anticuerpos biespecíficos mediante la regulación de la asociación en la superficie de contacto VH-VL. Otro objetivo es proporcionar métodos para producir eficazmente uno de los isómeros conformacionales de sc(Fv)₂.

20

Medios para resolver los problemas

- 25 Los presentes inventores seleccionaron la VH y VL de los anticuerpos como péptidos para someterlos a la regulación de la asociación, y llevaron a cabo una investigación a fondo sobre los métodos que permiten regular la asociación entre estas VH y VL.

- 30 Como resultado de ello, los inventores descubrieron que la asociación entre VH y VL podía regularse mediante la sustitución de aminoácidos presentes en la superficie de contacto VH-VL con aminoácidos cargados. Esto, a su vez, condujo a una formación más eficaz de las moléculas heterólogas que los métodos que utilizaban las técnicas de botón y ojal mencionados anteriormente.

- 35 Sorprendentemente, de acuerdo con los métodos de la presente divulgación, la sustitución con un solo tipo de aminoácido presente en cada lado de la superficie de contacto VH-VL (un total de dos aminoácidos para VH y VL) permite la producción eficaz de una molécula heteróloga. Desde el punto de vista de la antigenicidad, se prefieren menos sustituciones de aminoácidos. En una realización de la presente divulgación, una simple sustitución de un aminoácido presente en la superficie de contacto VH-VL, permite la formación eficaz de moléculas heterólogas.

- 40 Por consiguiente, las asociaciones entre VH y VL se pueden regular mediante los hallazgos descubiertos por los presentes inventores. La presente divulgación se puede aplicar no solo a la regulación de la asociación entre VH y VL, sino que también se puede aplicar a la regulación de las asociaciones entre polipéptidos arbitrarios.

- 45 Además, los presentes inventores confirmaron que la función realmente se conserva en los anticuerpos biespecíficos obtenidos mediante los métodos de regulación de la asociación de la presente divulgación.

- Como se ha descrito anteriormente, los presentes inventores desarrollaron con éxito métodos que pueden regular la asociación entre polipéptidos arbitrarios, y así completaron la presente divulgación.

- 50 La presente divulgación se refiere a métodos de regulación de la asociación de polipéptidos, polipéptidos cuya asociación se regula, y métodos de producción de dichos polipéptidos, y más concretamente, la invención proporciona:

- 55 [1] un método de producción de uno de los isómeros conformacionales de un anticuerpo sc(Fv)₂ que comprende una sustitución en un resto de aminoácido de la superficie de contacto del anticuerpo sc(Fv)₂, que está formado por la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo, de modo que se regulará la asociación del polipéptido en el anticuerpo sc(Fv)₂ para obtener de manera eficaz uno de los isómeros conformacionales de un anticuerpo sc(Fv)₂, comprendiendo el método las etapas de:

- 60 (a) modificar un ácido nucleico, que codifica un resto de aminoácido que forma la superficie de contacto del polipéptido, del ácido nucleico original, de modo que se inhiba la asociación del polipéptido que forma uno de los isómeros conformacionales en un anticuerpo sc(Fv)₂ que puede formar dos tipos de isómeros conformacionales;
 (b) cultivar células hospedadoras de modo que se exprese una secuencia de ácido nucleico modificada mediante la etapa (a); y
 (c) recuperar del cultivo de células hospedadoras dicho isómero conformacional de dicho anticuerpo sc(Fv)₂,

65

en el que la modificación de la etapa (a) consiste en modificar el ácido nucleico original de manera que se sustituyan

uno o más restos de aminoácidos en la superficie de contacto de modo que dos o más restos de aminoácidos, incluyendo el/los resto/s mutado/s, que forman la superficie de contacto, porten el mismo tipo de carga positiva o negativa.

5 [2] El método de [1], en el que dicho uno o más restos de aminoácido se sustituyen con:

- (a) ácido glutámico (E);
- (b) ácido aspártico (D);
- (c) lisina (K);
- 10 (d) arginina (R); o
- (e) histidina (H).

[3] El método de [1] o [2], en el que los restos de aminoácido que se sustituirán en la superficie de contacto son los restos de aminoácido de los siguientes (1) y (2) o de los siguientes (3) y (4):

- 15 (1) el resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena pesada, en la posición H39 de acuerdo con la numeración de Kabat;
- (2) el resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena ligera, en la posición L38 de acuerdo con la numeración de Kabat;
- 20 (3) el resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena pesada, en la posición H45 de acuerdo con la numeración de Kabat; y
- (4) el resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena ligera, en la posición L44 de acuerdo con la numeración de Kabat.

25 [4] El método de [3], en el que

- (1) el resto de aminoácido de la región variable de cadena pesada, de la posición H39 de acuerdo con la numeración de Kabat, es glutamina (Q);
- 30 (2) el resto de aminoácido de la región variable de cadena ligera, de la posición L38 de acuerdo con la numeración de Kabat, es glutamina (Q);
- (3) el resto de aminoácido de la región variable de cadena pesada, de la posición H45 de acuerdo con la numeración de Kabat, es leucina (L); y
- (4) el resto de aminoácido de la región variable de cadena ligera, de la posición L44 de acuerdo con la numeración de Kabat, es prolina (P).

35 [5] El método de uno cualquiera de [1] a [4], en el que el anticuerpo sc(Fv)₂ es un polipéptido monocatenario en el que dos regiones variables de cadena pesada y dos regiones variables de cadena ligera están unidas por enlazadores.

40 [6] El método de [5], en el que la longitud de los enlazadores que unen las regiones variables del anticuerpo sc(Fv)₂ es de 15 aminoácidos.

[7] El método de uno cualquiera de [1] a [6], en el que el anticuerpo sc(Fv)₂ es un anticuerpo humanizado.

45 [8] El método de uno cualquiera de [1] a [7], en el que el isómero conformacional de un anticuerpo sc(Fv)₂ es de tipo diacuerpo monocatenario o de tipo scFv bivalente.

[9] Un método de regulación de la asociación de un anticuerpo sc(Fv)₂ que comprende modificar un resto de aminoácido de la superficie de contacto del anticuerpo sc(Fv)₂, que está formado por la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo, de modo que se inhiba la asociación del anticuerpo sc(Fv)₂ que forma uno de los isómeros conformacionales, en el que dicha modificación es la sustitución de uno o más restos de aminoácido en la superficie de contacto en la que dos o más restos de aminoácidos, incluyendo el/los resto/s de aminoácido sustituido/s, que forman la superficie de contacto tendrán el mismo tipo de carga positiva o negativa.

55 [10] El método de [9], en el que dicho uno o más restos de aminoácido están sustituidos con:

- (a) ácido glutámico (E);
- (b) ácido aspártico (D);
- 60 (c) lisina (K);
- (d) arginina (R); o
- (e) histidina (H).

[11] El método de [9] o [10], en el que los restos de aminoácido que se sustituirán en la superficie de contacto son los restos de aminoácido de los siguientes (1) y (2) o de los siguientes (3) y (4):

(1) el resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena pesada, en la posición H39 de acuerdo con la numeración de Kabat;

(2) el resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena ligera, en la posición L38 de acuerdo con la numeración de Kabat;

5 (3) el resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena pesada, en la posición H45 de acuerdo con la numeración de Kabat; y

(4) el resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena ligera, en la posición L44 de acuerdo con la numeración de Kabat.

10 [12] El método de [11], en el que:

(1) el resto de aminoácido de la región variable de cadena pesada, de la posición H39 de acuerdo con la numeración de Kabat, es glutamina (Q);

15 (2) el resto de aminoácido de la región variable de cadena ligera, de la posición L38 de acuerdo con la numeración de Kabat, es glutamina (Q);

(3) el resto de aminoácido de la región variable de cadena pesada, de la posición H45 de acuerdo con la numeración de Kabat, es leucina (L); y

20 (4) el resto de aminoácido de la región variable de cadena ligera, de la posición L44 de acuerdo con la numeración de Kabat, es prolina (P).

[13] El método de uno cualquiera de [9] a [12], en el que el anticuerpo sc(Fv)₂ es un polipéptido monocatenario en el que dos regiones variables de cadena pesada y dos regiones variables de cadena ligera están unidas por enlazadores.

25 [14] El método de [13], en el que la longitud de los enlazadores que unen las regiones variables del anticuerpo sc(Fv)₂ es de 15 aminoácidos.

[15] El método de uno cualquiera de [9] a [14], en el que el anticuerpo sc(Fv)₂ es anticuerpo humanizado.

30 [16] El método de uno cualquiera de [9] a [15], en el que el isómero conformacional de un anticuerpo sc(Fv)₂ es de tipo diacuerpo monocatenario o de tipo scFv bivalente.

[17] Un isómero conformacional de un anticuerpo sc(Fv)₂ que se puede obtener mediante el método de uno cualquiera de [1] a [16].

35 [18] Una composición farmacéutica que comprende un isómero conformacional de un anticuerpo sc(Fv)₂ que se puede obtener mediante el método de uno cualquiera de [1] a [16] y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 representa modelos de la región Fv de SB04 humanizado. La parte (A) representa H39 y L38, que son los restos de aminoácido de la superficie de contacto VH-VL, y la parte (B) representa H45 y L44, que son los restos de aminoácido de la superficie de contacto VH-VL.

45 La Fig. 2 es una fotografía que representa los resultados de un ensayo de evaluación de las asociaciones entre las cadenas H y L de los anticuerpos modificados en H39 y L38. Estos resultados demuestran que, para todos los anticuerpos modificados, la proporción asociada del anticuerpo de interés se aumenta en comparación con el tipo silvestre.

50 Descripción de los carriles:

M: marcador molecular;

1: cadena H de XB12 humanizado (Q) + cadena L de XB12 humanizado (Q);

2: cadena H de XB12 humanizado (Q) + cadena L de SB04 humanizado (Q);

3: tipo silvestre: cadena H de XB12 humanizado (Q) + cadena L de XB12 humanizado (Q) + cadena L de SB04 humanizado (Q);

55 4: variante D: cadena H de XB12 humanizado (D) + cadena L de XB12 humanizado (Q) + cadena L de SB04 humanizado (D);

5: variante E: cadena H de XB12 humanizado (E) + cadena L de XB12 humanizado (Q) + cadena L de SB04 humanizado (E);

60 6: variante R: cadena H de XB12 humanizado (R) + cadena L de XB12 humanizado (Q) + cadena L de SB04 humanizado (R); y

7: variante K: cadena H de XB12 humanizado (K) + cadena L de XB12 humanizado (Q) + cadena L de SB04 humanizado (K).

65 La Fig. 3 representa los resultados de un ensayo de evaluación de la actividad de coagulación de los anticuerpos modificados en H39 y L38. Los resultados demuestran que el anticuerpo biespecífico, cuya cadena H de XB12 (H39) y cadena L de SB04 (L38) se han modificado a Glu, tiene una actividad de coagulación igual a o superior a la del tipo

silvestre.

La Fig. 4 representa los resultados de un ensayo de evaluación de la actividad de unión al Factor IXa de los anticuerpos modificados en H39 y L38. Los resultados demuestran que todos los anticuerpos modificados tienen una actividad de unión equivalente a la del tipo silvestre.

La Fig. 5 muestra los resultados de un ensayo de evaluación de la actividad de unión del Factor X de los anticuerpos modificados en H39 y L38. Los resultados muestran que todos los anticuerpos modificados tienen una actividad de unión equivalente a la del tipo silvestre.

La Fig. 6 es una fotografía que representa los resultados de un ensayo de evaluación de la asociación entre las cadenas H y L de los anticuerpos modificados en L44. Los resultados demuestran que, para todos los anticuerpos modificados, la proporción asociada del anticuerpo de interés se aumenta en comparación con la del tipo silvestre.

Descripción de los carriles:

15 1: tipo silvestre: cadena H de XB12 humanizado + cadena L de XB12 humanizado (P) + cadena L de SB04 humanizado (P);
 2: variante D: cadena H de XB12 humanizado + cadena L de XB12 humanizado (P) + cadena L de SB04 humanizado (D);
 20 3: variante E: cadena H de XB12 humanizado + cadena L de XB12 humanizado (P) + cadena L de SB04 humanizado (E);
 4: variante R: cadena H de XB12 humanizado + cadena L de XB12 humanizado (P) + cadena L de SB04 humanizado (R); y
 5: variante K: cadena H de XB12 humanizado + cadena L de XB12 humanizado (P) + cadena L de SB04 humanizado (K).

La Fig. 7 representa los resultados de un ensayo de evaluación de la actividad de coagulación de anticuerpos modificados en L44. Los resultados demuestran que todos los anticuerpos modificados tienen una actividad de coagulación superior a la del tipo silvestre.

La Fig. 8 representa los resultados de un ensayo de evaluación de la actividad de unión al Factor X de anticuerpos modificados en L44. Los resultados demuestran que todos los anticuerpos modificados tienen una actividad de unión equivalente a la del tipo silvestre.

La Fig. 9 es una fotografía que representa los resultados de un ensayo de evaluación de la asociación entre las cadenas H y L de los anticuerpos modificados en H39, L38 y L44. Los resultados demuestran que, para todos los anticuerpos modificados, la proporción asociada del anticuerpo de interés se aumenta en comparación con la del tipo silvestre.

Descripción de los carriles:

1: tipo silvestre: cadena H de XB12 humanizado (H39: Q) + cadena L de XB12 humanizado (L38: Q) + cadena L de SB04 humanizado (L38: Q, L44: P);
 2: variante E + D: cadena H de XB12 humanizado (H39: E) + cadena L de XB12 humanizado (L38: Q) + cadena L de SB04 humanizado (L38: E, L44: D);
 3: variante E + E: cadena H de XB12 humanizado (H39: E) + cadena L de XB12 humanizado (L38: Q) + cadena L de SB04 humanizado (L38: E, L44: E);
 4: variante E + R: cadena H de XB12 humanizado (H39: E) + cadena L de XB12 humanizado (L38: Q) + cadena L de SB04 humanizado (L38: E, L44: R);
 5: variante E + K: cadena H de XB12 humanizado (H39: E) + cadena L de XB12 humanizado (L38: Q) + cadena L de SB04 humanizado (L38: E, L44: K); y
 M: marcador molecular.

La Fig. 10 representa los resultados de un ensayo de evaluación de la actividad de coagulación en los anticuerpos modificados en H39, L38 y L44. Los resultados demuestran que los anticuerpos biespecíficos, cuya cadena H de XB12 (H39) y cadena L de SB04 (L38, L44) han sido modificadas, tienen una actividad de coagulación igual o superior a la del tipo silvestre.

La Fig. 11 representa los resultados de un ensayo de evaluación de la actividad de unión al Factor IXa en los anticuerpos modificados en H39, L38 y L44. Los resultados demuestran que todos los anticuerpos modificados tienen una actividad de unión equivalente a la del tipo silvestre.

La Fig. 12 presenta un diagrama esquemático de ejemplos de las conformaciones de un sc(Fv)₂ que tiene dos tipos de regiones variables de cadena pesada (VH1 y VH2) y dos tipos de regiones variables de cadena ligera (VL1 y VL2). Un sc(Fv)₂ que tiene la estructura de (a) está presente principalmente como dos tipos de isómeros conformacionales mostrados en (b).

La Fig. 13 representa los resultados de la separación del pico 1 y del pico 2 que corresponden a los isómeros conformacionales de u2-wz4, mediante cromatografía de intercambio catiónico.

La Fig. 14 representa los resultados de cartografía de péptidos del pico 1 y del pico 2 separados mediante cromatografía de intercambio catiónico.

5 La Fig. 15 es una fotografía que representa los resultados de un ensayo de SDS-PAGE reducida realizado tras el tratamiento con subtilisina de u2-wz4 antes de la separación del pico 1 y del pico 2, que son isómeros conformacionales de u2-wz4. Las conformaciones correspondientes a las bandas obtenidas se muestran a la derecha.

10 La Fig. 16 representa la diferencia en los patrones de degradación tras la proteólisis limitada por la subtilisina, que está causada por diferencias en la conformación de un scFv bivalente y un anticuerpo monocatenario. En el caso de la estructura de scFv bivalente, el fragmento de minicuerpo se forma en la zona enmarcada en puntos.

15 La Fig. 17 representa los resultados de un ensayo de cromatografía de filtración en gel tras la proteólisis limitada por la subtilisina en u2-wz4 antes de la separación y en el pico 1 y el pico 2, que son isómeros conformacionales de u2-wz4. Las posiciones de elución de los picos de minicuerpos se muestran mediante flechas.

La Fig. 18 representa los resultados de un ensayo de cromatografía de filtración en gel en u2-wz4, variante v1 y variante v3 tras la purificación a través de una columna inmovilizada de proteína de fusión MG10-GST.

20 La Fig. 19 representa los resultados de un ensayo de cromatografía de intercambio catiónico en u2-wz4, variante v1 y variante v3.

25 La Fig. 20 es una fotografía que representa los resultados del isoelectroenfoque de u2-wz4, del pico 1 purificado a partir de u2-wz4, del pico 2 purificado a partir de u2-wz4, de la variante v1 y de la variante v3.

La Fig. 21 representa los resultados del análisis de filtración en gel realizados tras la proteólisis limitada por la proteasa del pico 1 purificado a partir de u2-wz4, del pico 2 purificado a partir de u2-wz4, de la variante v1 y de la variante v3.

30 La Fig. 22 representa los resultados de un ensayo de evaluación de la actividad agonista de tipo TPO del pico 1 purificado a partir de u2-wz4, del pico 2 purificado a partir de u2-wz4, de la variante v1 y de la variante v3.

35 La Fig. 23 representa los resultados de los análisis de DSC del pico 1 purificado a partir de u2-wz4, del pico 2 purificado a partir de u2-wz4, de la variante v1 y de la variante v3.

La Fig. 24 representa el porcentaje de monómeros recuperados mediante análisis cromatográfico de filtración en gel en pruebas de aceleración térmica del pico 1 purificado a partir de u2-wz4, del pico 2 purificado a partir de u2-wz4, de la variante v1 y de la variante v3.

40 La Fig. 25 representa el porcentaje de contenido de isómero conformacional obtenido mediante el análisis cromatográfico de intercambio catiónico en las pruebas de aceleración térmica del pico 1 purificado a partir de u2-wz4, del pico 2 purificado a partir de u2-wz4, de la variante v1 y de la variante v3.

45 La Fig. 26 representa los resultados de un ensayo de evaluación de las actividades de coagulación de anticuerpos biespecíficos humanizados (A69 humanizado (hA69-PFL)/B26 humanizado (hB26-PF)/BBA humanizado (hAL-AQ)). Los resultados demuestran que las actividades de coagulación son equivalentes o superiores a las de los anticuerpos biespecíficos quiméricos.

50 La Fig. 27 presenta un diagrama esquemático que describe el método para mejorar la eficacia de la formación de anticuerpo biespecífico mediante la modificación de la región constante de cadena H. Los números que indican las posiciones de modificación se basan en el sistema de numeración de la UE (Kabat EA *et al.* 1991. Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico. NIH).

55 La Fig. 28 representa cromatogramas del análisis IEX de anticuerpos biespecíficos humanizados (de tipo IgG4) cuya superficie de contacto de CH3 ha sido modificada.

La Fig. 29 representa la proporción de formación de A-Homo, BiAb y B-Homo obtenida mediante el análisis IEX de anticuerpos biespecíficos humanizados (de tipo IgG4) cuya superficie de contacto de CH3 ha sido modificada.

60 La Fig. 30 representa el porcentaje de monómero recuperado tras ensayos de aceleración térmica a 60 °C durante 1 semana en BiAb purificado a partir de anticuerpos biespecíficos humanizados (de tipo IgG4) cuya superficie de contacto de CH3 ha sido modificada.

65 La Fig. 31 representa los resultados de un ensayo de evaluación de la actividad de coagulación de anticuerpos biespecíficos humanizados (de tipo IgG4) cuya superficie de contacto de CH3 ha sido modificada. Los resultados demuestran que las actividades de coagulación son equivalentes a las del anticuerpo biespecífico no modificado.

La Fig. 32 representa la proporción de la formación obtenida a través del análisis IEX para A-Homo, BiAb y B-Homo, que son anticuerpos biespecíficos humanizados (de tipo IgG1) cuya superficie de contacto de CH3 ha sido modificada.

5 Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente divulgación se refiere a métodos de regulación de la asociación de polipéptidos o de la asociación de heteromultímeros compuestos de polipéptidos.

10 En primer lugar, la presente divulgación proporciona métodos de regulación de la asociación de polipéptidos, incluyendo dichos métodos la etapa de modificar restos de aminoácido de un péptido original formando una superficie de contacto para inhibir la asociación dentro del polipéptido.

15 En la presente divulgación, el término "polipéptidos" se refiere normalmente a péptidos y proteínas cuya longitud es de aproximadamente diez aminoácidos o superior. Los polipéptidos normalmente se obtienen de organismos, pero no se limitan particularmente a los mismos, pudiendo estar compuestos, por ejemplo, de una secuencia diseñada artificialmente. También pueden ser cualquiera de los polipéptidos de origen natural, polipéptidos sintéticos, polipéptidos recombinantes o similares. Además, en los polipéptidos de la presente divulgación, también se incluyen fragmentos de los polipéptidos anteriormente mencionados.

20 En la presente divulgación, la expresión "asociación de polipéptidos" se refiere, por ejemplo, a una condición en la que interactúan dos o más regiones de polipéptido.

25 En la presente divulgación, la expresión "asociación de la regulación" se refiere a la regulación para lograr una condición de asociación deseada, y más concretamente, se refiere a la regulación de modo que no se formen asociaciones no deseadas en los polipéptidos.

30 En la presente divulgación, la expresión "superficie de contacto" se refiere normalmente a la superficie de asociación producida a partir de la asociación (interacción), y los restos de aminoácido que forman la superficie de contacto normalmente son uno o más restos de aminoácido incluidos en las regiones polipeptídicas que participan en la asociación, y más preferentemente, son restos de aminoácido que se aproximan entre sí durante la asociación y participan en la interacción. Más concretamente, esta interacción incluye, por ejemplo, los casos en los que los restos de aminoácido se aproximan durante la asociación para formar enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas o puentes de sal entre sí.

35 En la presente divulgación, la expresión, "restos de aminoácido que forman una superficie de contacto" se refiere más concretamente a los restos de aminoácido incluidos en la región polipeptídica que constituye la superficie de contacto. Por ejemplo, las regiones polipeptídicas que constituyen la superficie de contacto se refieren a regiones polipeptídicas responsables de la unión selectiva en o entre moléculas, tales como en anticuerpos, ligandos, receptores o sustratos. Más en concreto, en los anticuerpos, dichos ejemplos incluyen regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera.

45 "Modificación" de restos de aminoácido en los métodos de la presente divulgación se refiere concretamente a la sustitución de uno o más restos de aminoácido originales con otro/s resto/s de aminoácido, a la eliminación de uno o más restos de aminoácido originales, a la adición de nuevo/s resto/s de aminoácido, y similares, pero preferentemente se refiere a la sustitución de uno o más restos de aminoácido originales con otros restos de aminoácido.

50 En la presente divulgación, el término "polipéptidos" se refiere preferentemente a polipéptidos que forman dos o más tipos de isómeros conformacionales. Los isómeros conformacionales son proteínas cuyas secuencias de aminoácidos son idénticas, pero sus estructuras tridimensionales (terciarias) son diferentes. Normalmente, entre los isómeros conformacionales, también es diferente al menos una cualquiera de sus propiedades químicas o físicas.

55 Una realización preferida de la presente divulgación se refiere a métodos para obtener preferentemente (eficazmente) isómeros conformacionales deseables de entre dos o más tipos de posibles isómeros conformacionales. Más concretamente, una realización se refiere a métodos de modificación de uno o más restos de aminoácido que forman una superficie de contacto entre los polipéptidos para inhibir una asociación entre los polipéptidos que forman uno o más tipos de isómeros conformacionales de entre aquellos polipéptidos que pueden formar dos o más tipos de isómeros conformacionales.

60 Por ejemplo, cuando, en un polipéptido, existe de la primera a la cuarta región peptídica, y dos cualquiera de estas regiones se pueden asociar, se conciben los siguientes casos, en los que pueden existir principalmente tres tipos de isómeros conformacionales: (1) la primera y segunda regiones polipeptídicas asociadas, y la tercera y cuarta regiones polipeptídicas asociadas; (2) la primera y tercera regiones polipeptídicas asociadas, y la segunda y cuarta regiones polipeptídicas asociadas; y (3) la primera y cuarta regiones polipeptídicas asociadas, y la segunda y tercera regiones polipeptídicas asociadas.

En la circunstancia mencionada anteriormente, cuando se desea obtener preferentemente un polipéptido (isómero conformacional) asociado con la interacción de (1), por ejemplo, se modifican los restos de aminoácido que forman las superficies de contacto presentes en la primera, tercera o cuarta regiones polipeptídicas, de manera que se inhibe la asociación de la primera región polipeptídica con la tercera y cuarta regiones polipeptídicas.

5 Los métodos de la presente divulgación también se refieren a métodos de regulación de la asociación de heteromultímeros, incluyendo dichos métodos la etapa de modificar restos de aminoácido que forman la superficie de contacto entre los polipéptidos originales, de manera que se inhiba la asociación entre los polipéptidos.

10 En la presente divulgación, el término "heteromultímero" se refiere a un multímero proteico compuesto de más de un tipo de polipéptido, en el que los polipéptidos pueden estar asociados entre sí. Más concretamente, un "heteromultímero" incluye al menos un primer polipéptido y un segundo polipéptido; en este contexto, el segundo polipéptido es una molécula que difiere del primer polipéptido en al menos un resto de aminoácido. Además, sin limitación particular, los heteromultímeros tienen preferentemente especificidad de unión hacia al menos dos tipos diferentes de ligandos, antígenos, receptores, sustratos o similares. Además de un "heterodímero" formado por un primer y un segundo polipéptido, en el heteromultímero, puede existir otro tipo diferente de polipéptido. Más concretamente, los "heteromultímeros" de la presente divulgación no se limitan a los heterodímeros, e incluyen, por ejemplo, heterotrímeros y heterotetrámeros.

20 Las realizaciones preferidas de los métodos anteriormente mencionados son métodos de modificación de restos de aminoácido que forman la superficie de contacto entre los polipéptidos de heteromultímeros que pueden formar dos o más tipos de multímeros, de modo que se inhiba dicha asociación entre los polipéptidos que forman uno o más tipos de multímeros.

25 Por ejemplo, cuando cualquiera de los dos polipéptidos se pueden asociar en los multímeros de proteínas compuestos del primer al cuarto polipéptido, pueden existir principalmente los siguientes multímeros: (1) multímeros en los que el primer y el segundo polipéptido están asociados, y el tercer y el cuarto polipéptido están asociados; (2) multímeros en los que el primer y el tercer polipéptido están asociados y el segundo y el cuarto polipéptido están asociados; o (3) multímeros en los que el primer y el cuarto polipéptido están asociados, y el segundo y el tercer polipéptido están asociados.

En la circunstancia mencionada anteriormente, cuando se desea obtener preferentemente multímeros asociados con la interacción de (1), por ejemplo, los restos de aminoácido incluidos en el primer, tercer o cuarto polipéptido se pueden modificar de modo que se inhiba la asociación del primer polipéptido con el tercer y cuarto polipéptido.

35 Las realizaciones preferidas de los métodos de la presente divulgación para la regulación de la asociación de polipéptidos incluyen, por ejemplo, métodos en los que la modificación de restos de aminoácido que forman la superficie de contacto de los polipéptidos incluyen la introducción de mutaciones de restos de aminoácido en la superficie de contacto para que dos o más restos de aminoácido que forman una superficie de contacto tengan el mismo tipo de carga.

En los métodos mencionados anteriormente, mediante la modificación de dos o más restos de aminoácido que participan en una asociación en la superficie de contacto de manera que porten el mismo tipo de carga, las fuerzas de repulsión entre las cargas inhibirán la asociación entre estos restos de aminoácido.

45 Por lo tanto, en el método mencionado anteriormente, los restos de aminoácido que se van a modificar son, preferentemente, dos o más restos de aminoácido que se acercan entre sí durante la asociación en la región entre las regiones de polipéptidos que forman la superficie de contacto.

50 Los restos de aminoácido que se acercan entre sí durante la asociación se pueden identificar, por ejemplo, mediante análisis de las estructuras tridimensionales de los polipéptidos y la investigación de las secuencias de aminoácidos de las regiones polipeptídicas que forman la superficie de contacto cuando estos polipéptidos se asocian. Los restos de aminoácido que se acercan entre sí en la superficie de contacto serán dianas preferidas para las "modificaciones" en los métodos de la presente divulgación.

55 Se sabe que algunos aminoácidos son aminoácidos cargados. En general, la lisina (K), la arginina (R) y la histidina (H) se conocen como aminoácidos cargados positivamente (aminoácidos catiónicos), mientras que el aspartato (D), el glutamato (E) y similares, se conocen como aminoácidos cargados negativamente (aminoácidos aniónicos). Por lo tanto, en el contexto de la presente divulgación, los aminoácidos que portan el mismo tipo de carga se refieren preferentemente a aminoácidos que están cargados bien positiva o negativamente.

60 En los métodos de la presente divulgación, todos los restos de aminoácido mutados se modifican preferentemente para que tengan el mismo tipo de cargas, pero los métodos no se limitan necesariamente a dichos casos. Por ejemplo, cuando se introducen diversos restos de aminoácido mediante la modificación, puede haber unos cuantos restos de aminoácido no cargados entre estos restos de aminoácido.

El número de restos de aminoácido que sufren la modificación en los métodos de la presente divulgación no se limita a uno en particular. Sin embargo, cuando se modifican una o más regiones variables de un anticuerpo, se prefiere que solo se modifiquen unos cuantos restos de aminoácido para no reducir la actividad de unión al antígeno o aumentar la antigenicidad del anticuerpo resultante. Los métodos descritos en el presente documento pueden regular la asociación mediante la modificación de uno o ambos de los dos restos de aminoácido que se acercan entre sí en la superficie de contacto, como se indica en los ejemplos descritos a continuación. La expresión "unos cuantos", como se usa en el contexto anteriormente mencionado, se refiere a de aproximadamente uno a diez, por ejemplo, preferentemente de aproximadamente uno a cinco, más preferentemente de aproximadamente uno a tres, e incluso más preferentemente de aproximadamente uno a dos.

En una realización preferida, todos los restos de aminoácido que se introducen mediante modificación (es decir, se someten a modificación) se seleccionan preferentemente de entre los aminoácidos cargados positivamente mencionados anteriormente o, como alternativa, se seleccionan de entre todos entre los aminoácidos cargados negativamente anteriormente mencionados.

Además, en la presente divulgación, los restos de aminoácido preferidos que se introducirán incluyen ácido glutámico (E), ácido aspártico (D), lisina (K), arginina (R) o histidina (H).

En otra realización preferida de la presente divulgación, cuando un resto de aminoácido (X) que forma la superficie de contacto en un polipéptido original (antes de la modificación) ya está cargado, es preferible que el resto de aminoácido que se acerque y se enfrente a este resto de aminoácido (X) durante la asociación se modifique para que sea el mismo resto de aminoácido (o un resto de aminoácido con el mismo tipo de carga) que el resto de aminoácido (X). En esta realización, solo es necesario modificar uno de los restos de aminoácido que forman la superficie de contacto.

Las realizaciones preferidas de los métodos de la presente divulgación para la regulación de la asociación incluyen métodos en los que la modificación de restos de aminoácido que forman la superficie de contacto de los polipéptidos incluyen la introducción de mutaciones de restos de aminoácido en la superficie de contacto, de modo que los restos de aminoácido que forman un núcleo hidrófobo presente en la superficie de contacto se transforman en restos de aminoácido cargados.

En general, la expresión "núcleo hidrófobo" se refiere a una parte de un polipéptido que está formado por un conjunto de cadenas laterales de aminoácidos hidrófobos en el interior de los polipéptidos asociados. Los ejemplos de aminoácidos hidrófobos incluyen alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano y valina. Además, los restos de aminoácido distintos de los aminoácidos hidrófobos (por ejemplo, la tirosina) pueden participar en la formación de un núcleo hidrófobo. Este núcleo hidrófobo junto con una superficie hidrófila, en la que las cadenas laterales de aminoácidos hidrófilos se exponen al exterior, se convierten en la fuerza impulsora para potenciar la asociación de los polipéptidos hidrosolubles. Cuando hay aminoácidos hidrófobos de dos dominios diferentes presentes en una superficie molecular y se exponen a las moléculas de agua, la entropía aumentará y la energía libre aumentará. Por consiguiente, los dos dominios se asociarán entre sí para reducir la energía libre y volverse estables, y los aminoácidos hidrófobos de la superficie de contacto quedarán enterrados en el interior de la molécula para formar un núcleo hidrófobo.

Cuando se producen asociaciones de polipéptidos, la modificación de los aminoácidos hidrófobos que forman el núcleo hidrófobo con aminoácidos polares con carga, inhibe la formación del núcleo hidrófobo, y como resultado de ello, se inhibe la asociación de los polipéptidos.

Los expertos en la materia pueden identificar los sitios organizados (las regiones) y similares, así como la presencia del núcleo hidrófobo, mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos deseados. Por lo tanto, la presente divulgación se refiere a métodos de regulación de la asociación que incluyen la etapa de modificar los restos de aminoácido que participan en la formación del núcleo hidrófobo en la superficie de contacto en los restos de aminoácido cargados.

Los ejemplos de restos de aminoácido cargados, adecuados para su uso en los métodos descritos anteriormente, incluyen preferentemente ácido glutámico (E), ácido aspártico (D), lisina (K), arginina (R) e histidina (H).

Los métodos descritos en el presente documento, para la regulación de la asociación, se pueden usar como métodos para obtener (producir) preferentemente anticuerpos (polipéptidos) de interés y en la producción de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, polipéptidos, que tengan actividad similar a la de los anticuerpos, y similares.

En el presente documento, el término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio, e incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos mutantes (anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, minicuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpos) y anticuerpos multiespecíficos), siempre que presenten una actividad biológica deseada. Además, en el contexto de la presente divulgación, el "anticuerpo" puede ser un polipéptido o un heteromultímero. Los anticuerpos preferidos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos

quiméricos, anticuerpos humanizados y minicuerpos, tales como fragmentos de anticuerpos.

En el contexto de la presente divulgación, la expresión "anticuerpo multiespecífico" (usada en la presente descripción con el mismo significado que "anticuerpo poliespecífico") se refiere a un anticuerpo que se puede unir específicamente a diferentes tipos de epítomos. Más concretamente, los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos que tienen especificidad por al menos dos tipos diferentes de epítomos y, además de los anticuerpos que reconocen diferentes antígenos, también se incluyen los anticuerpos que reconocen diferentes epítomos en el mismo antígeno. Por ejemplo, cuando los antígenos son receptores heterólogos, los anticuerpos multiespecíficos pueden reconocer diferentes dominios que constituyen los receptores heterólogos. Como alternativa, cuando los antígenos son monómeros, los anticuerpos multiespecíficos reconocen múltiples sitios en los antígenos monómeros. Comúnmente, dichas moléculas se unen a dos antígenos (anticuerpos biespecíficos, que se usan en la presente descripción con el mismo significado que los "anticuerpos de doble especificidad"), pero pueden incluso tener especificidad hacia más antígenos (por ejemplo, tres tipos).

Además de los anticuerpos descritos anteriormente, los anticuerpos de la presente divulgación incluyen anticuerpos cuyas secuencias de aminoácidos se han modificado mediante sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos, o mediante quimerización, humanización y similares. Dichas modificaciones de la secuencia de aminoácidos, tales como sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos, y humanización y quimerización, se pueden realizar mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Del mismo modo, cuando los anticuerpos descritos en el presente documento se preparan como anticuerpos recombinantes, las secuencias de aminoácidos de las regiones variables y constantes de los anticuerpos también se pueden modificar mediante sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos, o mediante quimerización, humanización y similares.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser anticuerpos derivados de cualquier animal tal como un ratón, ser humano, rata, conejo, cabra o camello. Además, los anticuerpos pueden ser anticuerpos modificados, por ejemplo, anticuerpos quiméricos y, en particular, anticuerpos modificados que incluyen sustituciones de aminoácidos en su secuencia, tales como anticuerpos humanizados. Los anticuerpos pueden ser cualquier tipo de anticuerpo, tal como productos de la modificación de anticuerpos unidos con diversas moléculas, fragmentos de anticuerpos y minicuerpos.

Los "anticuerpos quiméricos" son anticuerpos preparados combinando secuencias derivadas de diferentes animales. Un ejemplo es un anticuerpo que tiene regiones variables (V) de cadena pesada y ligera de un anticuerpo de ratón y regiones constantes (C) de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano. Se pueden preparar anticuerpos quiméricos mediante métodos conocidos. Para obtener dichos anticuerpos quiméricos, por ejemplo, un ADN que codifica una región V de anticuerpo puede enlazarse con un ADN que codifica una región C de anticuerpo humano; el producto del enlace resultante se puede insertar en un vector de expresión; y la construcción se puede introducir en un hospedador para producir el anticuerpo quimérico.

Los "anticuerpos humanizados" también se denominan anticuerpos humanos remodelados, y se pueden obtener sustituyendo las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo humano con las CDR de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano, por ejemplo, de un ratón. En la técnica se conocen métodos de identificación de las CDR (Kabat *et al.*, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia *et al.*, *Nature* (1989) 342:877). También se conocen técnicas generales de recombinación genética con este fin (véase la solicitud de patente europea EP 125023, y el documento WO 96/02576). Por ejemplo, la CDR de un anticuerpo de ratón se puede determinar mediante métodos conocidos, y se puede preparar un ADN de modo que codifique un anticuerpo en el que la CDR se una a la región marco conservada (FR, *framework region*) de un anticuerpo humano. A continuación, se puede producir un anticuerpo humanizado usando un sistema que use vectores de expresión convencionales. Dichos ADN se pueden sintetizar por PCR usando, como cebadores, varios oligonucleótidos diseñados para que incluyan partes que solapen los extremos de ambas regiones CDR y FR (véase el método descrito en el documento WO 98/13388). Las FR de anticuerpos humanos unidas por las CDR se seleccionan de modo que las CDR formen un sitio de unión al antígeno adecuado. Si es necesario, se pueden modificar los aminoácidos de las FR de una región variable del anticuerpo de modo que las CDR de un anticuerpo humano remodelado puedan formar un sitio de unión al antígeno adecuado (Sato, K. *et al.*, *Cancer Res.* (1993) 53:851-856). Los restos de aminoácidos modificables de las FR incluyen partes que se unen directamente a un antígeno por medio de enlaces no covalentes (Amit *et al.*, *Science* (1986) 233: 747-53), partes que tienen algún impacto o efecto sobre la estructura de la CDR (Chotia *et al.*, *J. Mol. Biol.* (1987) 196: 901-17), y partes implicadas en la interacción entre VH y VL (documento EP 239400).

Cuando los anticuerpos descritos en el presente documento son anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados, las regiones C de estos anticuerpos derivan preferentemente de anticuerpos humanos. Por ejemplo, Cy1, Cy2, Cy3 y Cy4 se pueden usar para las cadenas H, mientras que C_k y C_l se pueden usar para las cadenas L. Mientras tanto, la región C del anticuerpo humano se puede modificar según se requiera para mejorar el anticuerpo o la estabilidad de producción. Un anticuerpo quimérico descrito en el presente documento incluye preferentemente una región variable de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano y una región constante de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado incluye preferentemente la CDR de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano, y

regiones FR y C de un anticuerpo humano. Las regiones variables se describen detalladamente en el apartado (3)-3. Las regiones constantes de los anticuerpos humanos incluyen secuencias de aminoácidos específicas, que varían dependiendo del isótopo del anticuerpo, por ejemplo, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgM, IgA, IgD e IgE. Las regiones constantes usadas para preparar los anticuerpos humanizados de la presente divulgación pueden ser las regiones constantes de anticuerpos de cualquier isotipo. Preferentemente, se usa una región constante de una IgG humana, aunque la divulgación no se limita a las mismas. Las FR derivadas de un anticuerpo humano, que se usan para preparar anticuerpos humanizados, no están particularmente limitadas, y por tanto pueden derivar de un anticuerpo de cualquier isotipo.

Las regiones variables y constantes de los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente divulgación se pueden modificar mediante deleciones, sustituciones, inserciones y/o adiciones, siempre que los anticuerpos presenten la misma especificidad de unión que la de los anticuerpos originales.

Dado que su antigenicidad en el cuerpo humano se ha atenuado, se espera que los anticuerpos quiméricos y humanizados, usando secuencias derivadas de seres humanos, encuentren utilidad cuando se administren a seres humanos con fines terapéuticos o similares.

Además, los minicuerpos son útiles como anticuerpos, debido a sus características cinéticas *in vivo* y a la producción de bajo coste usando *E. coli*, células vegetales o similares.

Los fragmentos de anticuerpos son un tipo de minicuerpo. El término "minicuerpos" incluye anticuerpos que incluyen un fragmento de anticuerpo como una unidad estructural parcial. Los minicuerpos de la presente divulgación no están particularmente limitados por su estructura ni por su método de producción, siempre que tengan la actividad de unión al antígeno. Algunos minicuerpos tienen una actividad superior a la de un anticuerpo entero (Orita *et al*, *Blood* (2005) 105:562-566). En el presente documento, los "fragmentos de anticuerpos" no están particularmente limitados, siempre que sean una parte de un anticuerpo completo (por ejemplo, toda la IgG). Sin embargo, los fragmentos de anticuerpos incluyen preferentemente una región variable de cadena pesada (VH) o una región variable de cadena ligera (VL). Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos preferidos son: Fab, F(ab')₂, Fab' y Fv. La secuencia de aminoácidos de una VH o VL en un fragmento de anticuerpo se puede modificar por sustitución, deleción, adición y/o inserción. Además, algunas partes de una VH y VL se pueden eliminar, siempre que los fragmentos resultantes conserven su capacidad de unión al antígeno. Por ejemplo, de los fragmentos de anticuerpos descritos anteriormente, "Fv" es un fragmento de anticuerpo mínimo compuesto por los sitios de reconocimiento del y de unión al antígeno completos. "Fv" es un dímero (dímero VH-VL) compuesto de una unidad de VH y una unidad de VL unida muy fuertemente mediante unión no covalente. Un sitio de unión al antígeno se compone en la superficie del dímero VH-VL de las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cada región variable. Seis CDR confieren al anticuerpo un sitio de unión al antígeno. Sin embargo, incluso una región variable (o la mitad de un Fv compuesto de solo tres CDR específicas del antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque su afinidad es inferior a la del sitio de unión completo. Por lo tanto, las moléculas inferiores al Fv también se incluyen en el contexto de los fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento. Las regiones variables de un fragmento de anticuerpo también pueden estar quimerizadas o humanizadas.

Los minicuerpos incluyen, preferentemente, tanto VH como VL. Los ejemplos de minicuerpos adecuados incluyen fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, y scFv (Fv monocatenario), que se pueden preparar usando los fragmentos de anticuerpos, (Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* (1988) 85: 5879-83; Plickthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies". Vol. 113, Resenbun y Moore (eds.), Springer Verlag, Nueva York, pág. 269-315, (1994)); diacuerpos (Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* (1993) 90:6444-8; documento EP 404097; documento W093/11161; Johnson *et al.*, *Method in Enzymology* (1991) 203: 88-98; Holliger *et al.*, *Protein Engineering* (1996) 9:299-305; Perisic *et al.*, *Structure* (1994) 2:1217-26; John *et al.*, *Protein Engineering* (1999) 12(7):597-604; Atwell *et al.*, *Mol. Immunol.* (1996) 33:1301-12); sc(Fv)₂ (Hudson *et al.*, *J Immunol. Methods* (1999) 231:177-89; Orita *et al.*, *Blood* (2005) 105:562-566); triacuerpos (*Journal of Immunological Methods* (1999) 231: 177-89); y diacuerpos en tándem (*Cancer Research* (2000) 60:4336-41).

Un fragmento de anticuerpo se puede preparar mediante el tratamiento de un anticuerpo con una enzima, por ejemplo, una proteasa, tal como papaína o pepsina (véase Morimoto *et al.*, *J. Biochem. Biophys. Methods* (1992) 24: 107-17; Brennan *et al.*, *Science* (1985) 229:81). Como alternativa, los fragmentos de anticuerpos también se pueden producir mediante recombinación genética basándose en su secuencia de aminoácidos.

Se puede preparar un minicuerpo que tenga una estructura producto de la modificación de un fragmento de anticuerpo usando fragmentos de anticuerpos obtenidos mediante tratamiento enzimático o recombinación genética. Como alternativa, tras la construcción de un gen que codifica todo un minicuerpo y la introducción de la construcción en un vector de expresión, el minicuerpo puede expresarse en células hospedadoras apropiadas (véase, por ejemplo, Co *et al.*, *J. Immunol.* (1994) 152: 2968-76; Better y Horwitz, *Methods Enzymol.* (1989) 178: 476-96; Pluckthun y Skerra, *Methods Enzymol.* (1989) 178: 497-515; Lamoyi, *Methods Enzymol.* (1986) 121: 652-63; Rousseaux *et al.*, *Methods Enzymol.* (1986) 121: 663-9; Bird y Walker, *Trends Biotechnol.* (1991) 9: 132-7).

Los scFv descritos anteriormente son polipéptidos monocatenarios que incluyen dos regiones variables unidas entre sí a través de un enlazador o similar, según se requiera. Las dos regiones variables de un scFv normalmente son una VH y una VL, pero un scFv puede incluir dos VH o dos VL. En general, los polipéptidos scFv incluyen un enlazador entre los dominios VH y VL, formando de este modo una parte emparejada de VH y VL necesaria para la unión al antígeno. Por lo general, se usa un enlazador peptídico compuesto de diez o más aminoácidos como el enlazador entre VH y VL cuando se forma una parte emparejada intramolecular entre VH y VL. Sin embargo, los enlazadores del scFv de la presente divulgación no se limitan a dichos enlazadores peptídicos, siempre que no inhiban la formación de un scFv. Para revisar los scFv, véase Pluckthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibody", Vol. 113 (Rosenburg y Moore ed., Springer Verlag, NY, pág. 269-315 (1994)).

El término, "diacuerpos (Db)" se refiere a fragmentos de anticuerpo bivalentes construidos mediante la fusión de genes (P. Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90: 6444-6448 (1993); documento EP 404,097; documento W093/11161 y similares). Los diacuerpos son dímeros compuestos de dos cadenas polipeptídicas, en los que cada cadena polipeptídica incluye, dentro de la misma cadena, una región variable de cadena ligera (VL) y una región variable de cadena pesada (VH) conectada con un enlazador lo suficientemente corto como para desactivar la interacción de estas dos regiones, por ejemplo, un enlazador de aproximadamente cinco restos de aminoácido. VL y VH codificadas en la misma cadena polipeptídica formarán un dímero, debido a que el enlazador entre VL y VH es demasiado corto como para formar un fragmento de la región V monocatenaria. Por lo tanto, el diacuerpo resultante tiene dos sitios de unión al antígeno. En el presente documento, cuando VL y VH dirigidas contra dos epítomos diferentes (a y b) se expresan al mismo tiempo como combinaciones de VL_a-VH_b y VL_b-VH_a conectadas con un enlazador de aproximadamente cinco restos, se secretan como Db biespecíficos. En este caso, los dos epítomos diferentes pueden ser epítomos en dos sitios diferentes del mismo antígeno, o epítomos en dos sitios diferentes, cada uno en dos antígenos diferentes.

Dado que los diacuerpos incluyen dos moléculas de scFv, se componen de cuatro regiones variables, y por consiguiente, tienen dos sitios de unión al antígeno. Cuando el objetivo es formar un diacuerpo, a diferencia del caso de los scFv, que no forman dímeros, en general, los enlazadores que forman una conexión entre VH y VL en cada una de las moléculas scFv, son enlazadores de aproximadamente cinco aminoácidos cuando se usan como enlazadores peptídicos. Sin embargo, los enlazadores de scFv para la formación de diacuerpos no se limitan a dichos enlazadores peptídicos siempre que no interfieran con la expresión de scFv y con la formación de diacuerpos.

Los ejemplos de polipéptidos o heteromultímeros preferidos sometidos a los métodos de la presente divulgación incluyen polipéptidos o heteromultímeros compuestos por regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera de anticuerpos. Más preferentemente, las realizaciones preferidas de la presente divulgación son métodos de regulación de la asociación cuando los polipéptidos o los heteromultímeros de la presente divulgación incluyen dos o más tipos de regiones variables de cadena pesada y dos o más tipos de regiones variables de cadena ligera. Dichos polipéptidos o heteromultímeros son preferentemente aquellos que reconocen dos o más tipos de epítomos, y los ejemplos incluyen los anticuerpos multiespecíficos.

Más preferentemente, los ejemplos de anticuerpos multiespecíficos de la presente divulgación incluyen anticuerpos biespecíficos.

Más concretamente, las realizaciones preferidas de la presente divulgación se refieren, por ejemplo, a métodos de regulación de la asociación de anticuerpos biespecíficos compuestos de dos tipos de regiones variables de cadena pesada (primera cadena pesada y segunda cadena pesada) y dos tipos de regiones variables de cadena ligera (primera cadena ligera y la segunda cadena ligera).

Describiendo los "anticuerpos biespecíficos" de las realizaciones preferidas de la presente divulgación con mayor precisión, la "primera cadena pesada" mencionada anteriormente se refiere a una de las dos cadenas H que forman el anticuerpo, y la segunda cadena H se refiere a la otra cadena H que es diferente de la primera cadena H. Es decir, de las dos cadenas H, una de ellas se puede definir arbitrariamente como la primera cadena H y la otra se puede definir como la segunda cadena H. Del mismo modo, la "primera cadena ligera" se refiere a una de las dos cadenas L que forman el anticuerpo biespecífico, y la "segunda cadena L" se refiere a la otra cadena L que es diferente de la primera cadena L. De las dos cadenas L, una de ellas se puede definir arbitrariamente como la primera cadena L y la otra se puede definir como la segunda cadena L. Normalmente, la primera cadena L y la primera cadena H derivan del mismo anticuerpo que reconoce un cierto antígeno (o epítopo), y la segunda cadena L y la segunda cadena H también derivan del mismo anticuerpo que reconoce un cierto antígeno (o epítopo). En el presente documento, el par de cadena H-cadena L formado por la primera cadena H y cadena L se denomina el primer par, y el par de cadena L-cadena H formado por la segunda cadena H y cadena L se denomina el segundo par. Un antígeno (o epítopo) usado para producir el anticuerpo del que deriva el segundo par es preferentemente diferente del antígeno usado para producir el anticuerpo del que deriva el primer par. Más concretamente, los antígenos reconocidos por el primer par y el segundo par pueden ser los mismos, pero se prefieren diferentes antígenos (o epítomos) para el reconocimiento. En el presente documento, las cadenas H y las cadenas L del primer par y segundo par tienen preferentemente secuencias de aminoácidos que difieren entre sí. Cuando el primer y segundo par reconocen diferentes epítomos, el primer y el segundo par pueden reconocer un antígeno completamente diferente, o pueden reconocer diferentes sitios (diferentes epítomos) del mismo antígeno. Además,

uno de ellos puede reconocer un antígeno tal como una proteína, un péptido, un gen o azúcar, y el otro puede reconocer sustancias citotóxicas tales como sustancias radiactivas, agentes quimioterapéuticos o toxinas derivadas de células. Sin embargo, cuando se desea producir un anticuerpo que tenga pares formados por combinaciones específicas de cadenas H y cadenas L, las cadenas H y las cadenas L específicas se pueden determinar arbitrariamente para que sean el primer par y el segundo par.

Los "anticuerpos biespecíficos" anteriormente mencionados no se limitan necesariamente a anticuerpos compuestos de dos tipos de cadenas pesadas y dos tipos de cadenas ligeras, pudiendo ser, por ejemplo, anticuerpos (por ejemplo, sc(Fv)₂) que tienen una estructura en la que dos tipos de regiones variables de cadena pesada y dos tipos de regiones variables de cadena ligera están unidos para formar una sola cadena.

En cuanto a los genes que codifican la cadena H o la cadena L de los anticuerpos antes de la introducción de mutaciones mediante los métodos de la presente divulgación (en el presente documento, se puede denominar simplemente "un anticuerpo de la presente divulgación"), se pueden usar secuencias conocidas o se pueden obtener mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se pueden obtener a partir de una biblioteca de anticuerpos, o se pueden obtener mediante la clonación de genes que codifiquen el anticuerpo a partir de hibridomas que produzcan anticuerpos monoclonales.

En lo que respecta a las bibliotecas de anticuerpos, se conocen bien muchas bibliotecas de anticuerpos, y puesto que se conocen métodos de producción de bibliotecas de anticuerpos, los expertos en la materia pueden obtenerlas de forma apropiada. Por ejemplo, con respecto a las fagotecas de anticuerpos, se puede hacer referencia a la bibliografía tal como de Clackson *et al.*, *Nature* 1991, 352: 624-8; Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 1991, 222: 581-97; Waterhouses *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 1993, 21: 2265-6; Griffiths *et al.*, *EMBO J.* 1994, 13: 3245-60; Vaughan *et al.*, *Nature Biotechnology* 1996, 14: 309-14; y publicación de patente japonesa Kohyo n.º (JP-A) H10-504970 (publicación de fase nacional japonesa no examinada correspondiente a una publicación internacional no japonesa). Además, se pueden usar métodos conocidos tales como métodos que usan células eucariotas como bibliotecas (documento WO95/15393) y métodos de presentación en ribosomas. Además, también son conocidas las técnicas de obtención de anticuerpos humanos mediante selección usando bibliotecas de anticuerpos humanos. Por ejemplo, se pueden expresar regiones variables de anticuerpos humanos en la superficie de fagos como anticuerpos monocatenarios (scFv) usando métodos de presentación en fagos, y se pueden seleccionar fagos que se unan a antígenos. El análisis genético de los fagos seleccionados puede determinar las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de anticuerpos humanos que se unen a los antígenos. Una vez que se revelan las secuencias de ADN de los scFv que se unen a los antígenos, se pueden producir vectores de expresión adecuados basándose en estas secuencias para obtener anticuerpos humanos. Estos métodos ya son bien conocidos, y se puede hacer referencia a los documentos W092/01047, W092/20791, W093/06213, W093/11236, W093/19172, W095/01438 y W095/15388.

En cuanto a los métodos de obtención de genes que codifican anticuerpos a partir de hibridomas, se pueden usar técnicas conocidas que implican el uso de antígenos o células deseadas que expresen los antígenos deseados como antígenos sensibilizantes, usando estos para realizar las inmunizaciones de acuerdo con los métodos de inmunización convencionales, fusionando las células inmunitarias así obtenidas con células parentales conocidas mediante métodos de fusión celular habituales, rastreando las células productoras de anticuerpos monoclonales (hibridomas) mediante métodos de rastreo habituales, sintetizando los ADNc de regiones variables de anticuerpo (regiones V) a partir de los ARNm de los hibridomas obtenidos usando una transcriptasa inversa, y uniéndolos a los ADN que codifican las regiones constantes del anticuerpo deseado (regiones C).

Más concretamente, sin limitarse particularmente a los siguientes ejemplos, los antígenos sensibilizantes para obtener los genes de anticuerpo mencionados anteriormente que codifican las cadenas H y cadenas L incluyen tanto antígenos completos con inmunogenicidad como antígenos incompletos compuestos de haptenos y similares que no muestran antigenicidad. Por ejemplo, se pueden usar proteínas de longitud completa y péptidos parciales de proteínas de interés. Además, se sabe que las sustancias compuestas de polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y similares, se pueden convertir en antígenos. Por lo tanto, no existen limitaciones particulares sobre los antígenos de los anticuerpos de la presente divulgación. Se pueden preparar antígenos mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, y se pueden preparar, por ejemplo, mediante los siguientes métodos que usan baculovirus (por ejemplo, véase el documento WO98/46777). Se pueden producir hibridomas, por ejemplo, mediante los siguientes métodos de Milstein *et al.* (G. Kohler y C. Milstein, *Methods Enzymol.* 1981, 73:3-46). Cuando la inmunogenicidad de un antígeno es baja, se puede unir a una macromolécula que tenga inmunogenicidad, tal como albúmina, y a continuación, usarse para la inmunización. Además, al unir los antígenos a otras moléculas en caso necesario, se pueden convertir en antígenos solubles. Cuando se usan moléculas transmembrana, tales como receptores como antígenos, se pueden usar partes de las regiones extracelulares de los receptores como fragmentos, o se pueden usar células que expresan moléculas transmembrana en su superficie celular como inmunógenos.

Se pueden obtener células productoras de anticuerpos inmunizando animales usando los antígenos sensibilizantes adecuados descritos anteriormente. Como alternativa, se pueden preparar células productoras de anticuerpos mediante inmunización *in vitro* de linfocitos que pueden producir anticuerpos. Se pueden usar diversos mamíferos

como animales para la inmunización, en la que, en general, se usan roedores, lagomorfos y primates. Los ejemplos de dichos animales incluyen ratones, ratas y hámsteres como roedores, conejos como lagomorfos, y monos incluyendo monos *Cynomolgus*, monos *Rhesus*, babuinos *Hamadryas* y chimpancés como primates. Además, también se conocen animales transgénicos que portan repertorios de genes de anticuerpos humanos, y se pueden obtener anticuerpos humanos usando estos animales (véase el documento W096/34096; Mendez *et al.*, *Nat. Genet.* 1997, 15: 146-56). En lugar de usar dichos animales transgénicos, por ejemplo, se pueden obtener los anticuerpos humanos deseados que tengan actividad de unión a antígenos deseados sensibilizando linfocitos humanos *in vitro* con los antígenos deseados o células que expresen los antígenos deseados, y a continuación, fusionando los linfocitos sensibilizados con células de mieloma humano tales como U266 (véase la publicación Kokoku de solicitud de patente japonesa n.º H1-59878 (solicitud de patente japonesa examinada y aprobada publicada para oposición)). Además, se pueden obtener anticuerpos humanos deseados inmunizando animales transgénicos que porten un repertorio completo de genes de anticuerpos humanos, con los antígenos deseados (véanse los documentos WO93/12227, W092/03918, W094/02602, W096/34096 y WO96/33735).

La inmunización animal se puede llevar a cabo diluyendo y suspendiendo apropiadamente un antígeno sensibilizante en solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica o similares, y formando una emulsión mezclando un adyuvante si es necesario, seguido de una inyección intraperitoneal o subcutánea en los animales. Tras ello, el antígeno sensibilizante mezclado con adyuvante incompleto de Freund se administra preferentemente varias veces cada cuatro a 21 días. Se puede confirmar la producción de anticuerpos midiendo el título del anticuerpo diana en el suero del animal usando métodos convencionales.

Se pueden fusionar células productoras de anticuerpos, obtenidas de linfocitos o de animales inmunizados con un antígeno deseado, con células de mieloma usando agentes de fusión convencionales (por ejemplo, polietilenglicol) para generar hibridomas (Goding, "Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", Academic Press, 1986, 59-103). Cuando se requiera, se pueden cultivar y hacer crecer células de hibridoma, y se puede medir la especificidad de unión del anticuerpo producido a partir de estos hibridomas usando métodos de análisis conocidos tales como inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA) y un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Tras ello, se pueden subclonar hibridomas que producen anticuerpos de interés en los que se ha determinado la especificidad, afinidad o actividad mediante métodos tales como la dilución limitante.

A continuación, los genes que codifican los anticuerpos seleccionados de hibridomas o de células productoras de anticuerpos (linfocitos sensibilizados y similares), se pueden clonar usando sondas que se pueden unir específicamente a los anticuerpos (por ejemplo, oligonucleótidos complementarios a las secuencias que codifican las regiones constantes de los anticuerpos). También es posible la clonación a partir de ARNm usando RT-PCR. Las inmunoglobulinas se clasifican en cinco clases diferentes, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Estas clases se dividen además en varias subclases (isotipos) (por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG-4; IgA-1 e IgA-2; y similares). Las cadenas H y cadenas L usadas en la presente divulgación para producir anticuerpos no están particularmente limitadas y pueden derivar de anticuerpos pertenecientes a cualquiera de estas clases o subclases; sin embargo, se prefieren, en particular, las IgG.

En el presente documento, es posible modificar genes que codifican la cadena H y genes que codifican la cadena L usando técnicas de ingeniería genética. Los anticuerpos modificados genéticamente, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados que se han modificado artificialmente para reducir la antigenicidad heteróloga y similares frente a seres humanos, se pueden producir de forma apropiada en caso necesario para anticuerpos tales como anticuerpos de ratón, anticuerpos de rata, anticuerpos de conejo, anticuerpos de hámster, anticuerpos de oveja y anticuerpos de camello. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos compuestos de regiones variables de cadena H y de cadena L de un anticuerpo de mamífero no humano, tal como anticuerpo de ratón, y regiones constantes de cadena H y cadena L de un anticuerpo humano. Se pueden obtener uniendo los ADN que codifican las regiones variables de un anticuerpo de ratón con el ADN que codifica una región constante de un anticuerpo humano, incorporándolos a un vector de expresión, e introduciendo el vector en un hospedador para la producción del anticuerpo. Se puede sintetizar un anticuerpo humanizado, que también se denomina anticuerpo humano remodelado, mediante la PCR de una serie de oligonucleótidos producidos de manera que tengan partes solapantes en los extremos de secuencias de ADN diseñadas para unirse a las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo de un mamífero no humano, tal como un ratón. El ADN obtenido se puede unir a un ADN que codifique una región constante de anticuerpo humano. El ADN unido se puede incorporar a un vector de expresión, y el vector se puede introducir en un hospedador para producir el anticuerpo (véanse los documentos EP239400 y WO96/02576). Se seleccionan FR de anticuerpos humanos que están unidas por medio de las CDR de modo que las CDR formen un sitio de unión al antígeno favorable. En caso necesario, se pueden sustituir aminoácidos de la región marco conservada de una región variable de anticuerpo de modo que las CDR del anticuerpo humano remodelado formen un sitio de unión al antígeno apropiado (K. Sato *et al.*, *Cancer Res.* 1993, 53:851-856).

Además de las técnicas de humanización descritas anteriormente, los anticuerpos se pueden modificar para mejorar sus propiedades biológicas, por ejemplo, afinidad antigénica. Dichas modificaciones se pueden llevar a cabo usando métodos tales como mutagénesis dirigida a sitio (véase, por ejemplo, Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82: 488), mutagénesis de PCR, y mutagénesis de casetes. En general, los anticuerpos mutantes con propiedades

biológicas que se han mejorado muestran una homología y/o similitud de secuencia de aminoácidos del 70 % o superior, más preferentemente del 80 % o superior, y aún más preferentemente del 90 % o superior (por ejemplo, del 95 % o superior, del 97 %, 98 %, 99 % y etc.), en comparación con la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo original. En el presente documento, homología y/o similitud de secuencia se define como la proporción de restos de aminoácidos que son homólogos (mismo resto) o similares (restos de aminoácidos clasificados en el mismo grupo basándose en las propiedades generales de las cadenas laterales de aminoácidos) a los restos del anticuerpo original, después de haber maximizado el valor de homología de secuencia por alineación de secuencias e introducción de huecos, en caso necesario. En general, los restos de aminoácidos naturales se clasifican en grupos según las características de sus cadenas laterales: (1) hidrófobos: alanina, isoleucina, norleucina, valina, metionina y leucina; (2) hidrófilos neutros: asparagina, glutamina, cisteína, treonina y serina; (3) ácidos: ácido aspártico y ácido glutámico; (4) básicos: arginina, histidina y lisina; (5) restos que afectan a la orientación de la cadena: glicina y prolina; y (6) aromáticos: tirosina, triptófano y fenilalanina.

En general, un total de seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR; regiones hipervariables) presentes en las regiones variables de cadena H y cadena L interaccionan para formar el/los sitio/s de unión al antígeno de un anticuerpo. Se sabe que incluso una de estas regiones variables tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque la afinidad será inferior que cuando están incluidos todos los sitios de unión. Por lo tanto, los genes de anticuerpo de la presente divulgación que codifican la cadena H y la cadena L solo tienen que codificar partes de fragmentos que tienen cada uno de los sitios de unión al antígeno de cadena H y cadena L, y los polipéptidos codificados por estos genes solo tienen que mantener la afinidad con los antígenos deseados.

Los métodos de la presente divulgación para la regulación de la asociación permiten obtener preferentemente (eficazmente), por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos deseados descritos anteriormente. Más concretamente, se pueden formar de manera eficaz los anticuerpos biespecíficos deseados que son heteromultímeros a partir de una mezcla de monómeros.

Más adelante, en el presente documento, se describe detalladamente el caso de anticuerpos biespecíficos de tipo IgG compuestos de dos tipos de regiones variables de cadena pesada (VH1 y VH2) y dos tipos de regiones variables de cadena ligera (VL1 y VL2); sin embargo, los métodos de la presente divulgación se pueden aplicar de manera similar a otros heteromultímeros.

Cuando se desea obtener un anticuerpo biespecífico que reconozca uno de los epítomos con una primera región variable de cadena pesada (VH1) y una primera región variable de cadena ligera (VL1) y el otro epítomo con una segunda región variable de cadena pesada (VH2) y una segunda región variable de cadena ligera (VL2), la expresión de cada uno de los cuatro tipos de cadenas para producir este anticuerpo puede producir teóricamente 10 tipos de moléculas de anticuerpo.

En este caso, la molécula de anticuerpo deseada puede obtenerse preferentemente si la regulación se lleva a cabo de una manera que inhiba la asociación entre los polipéptidos, por ejemplo, VH1 y VL2 y/o VH2 y VL1.

Un ejemplo incluye la modificación de restos de aminoácido que forman las superficies de contacto entre el polipéptido de VH1 y el polipéptido de VL2, y/o el polipéptido de VH2 y el polipéptido de VL1 como se describe anteriormente para inhibir las asociaciones entre estos polipéptidos.

Además, las asociaciones entre las cadenas pesadas (VH1 y VH2) o entre las cadenas ligeras (VL1 y VL2) también se pueden suprimir usando los métodos de la presente divulgación para la regulación de la asociación.

Las regiones variables de cadena pesada se componen habitualmente de tres regiones CDR y regiones FR como se ha descrito anteriormente. En una realización preferida de la presente divulgación, se pueden seleccionar de forma apropiada restos de aminoácidos sometidos a "modificación" de entre los restos de aminoácidos situados en las regiones CDR o regiones FR. En general, la modificación de los restos de aminoácidos en las regiones CDR puede reducir la actividad de unión a los antígenos. Por lo tanto, en la presente divulgación, los restos de aminoácidos sometidos a "modificación" no están limitados particularmente, pero se prefiere seleccionarlos de forma apropiada de entre los restos de aminoácidos situados en las regiones FR.

En cuanto a los polipéptidos deseados, cuya asociación se va a regular mediante los métodos de la presente divulgación, los expertos en la materia pueden encontrar apropiadamente los tipos de restos de aminoácido que se acercan entre sí en la superficie de contacto de las FR durante la asociación.

Además, los expertos en la materia pueden obtener apropiadamente las secuencias que se pueden usar como FR de la región variable de los anticuerpos de organismos, tales como seres humanos o ratones, usando bases de datos públicas. Más concretamente, la información de secuencias de aminoácidos de las regiones FR se puede obtener por medios descritos más adelante en los ejemplos.

Los ejemplos específicos de restos de aminoácidos que se acercan entre sí en la superficie de contacto de las FR durante la asociación en los anticuerpos biespecíficos que se indican en los siguientes ejemplos incluyen glutamina

(Q) en la posición 39 de la región variable de cadena pesada (región FR2) (por ejemplo, en la posición 39 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6) y la glutamina (Q) opuesta (en contacto) en la posición 38 de la región variable de cadena ligera (región FR2) (por ejemplo, en la posición 44 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8). Además, los ejemplos favorables incluyen leucina (L) en la posición 45 de la región variable de cadena pesada (FR2) (por ejemplo, en la posición 45 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6) y la prolina opuesta (P) en la posición 44 de la región variable de cadena ligera (FR2) (por ejemplo, en la posición 50 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8). Estas posiciones se numeran de acuerdo con el documento creado por Kabat *et al.* (Kabat EA *et al.* 1991. Secuencia de proteínas de interés inmunológico. NIH).

10 Como se indica en los siguientes ejemplos, los anticuerpos deseados se pueden obtener preferentemente mediante la modificación de estos restos de aminoácido y la realización de los métodos de la presente divulgación.

15 Como se sabe que estos restos de aminoácido están muy conservados en los seres humanos y en los ratones (*J. Mol. Recognit.* 2003; 16: 113-120), es posible regular la asociación de las regiones variables de los anticuerpos para la asociación de VH-VL de anticuerpos distintos de los indicados en los ejemplos modificando los restos de aminoácido correspondientes a los restos de aminoácido anteriormente mencionados.

20 Más concretamente, en una realización preferida, la presente divulgación proporciona anticuerpos (polipéptidos (por ejemplo, sc(Fv)₂), heteromultímeros (por ejemplo, anticuerpos de tipo IgG o similares) compuestos de regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera, que son anticuerpos cuyos restos de aminoácido (1) y (2), o (3) y (4) descritos a continuación portan el mismo tipo de cargas:

- (1) un resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena pesada y que corresponde a la posición 39 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;
- 25 (2) un resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena ligera y que corresponde a la posición 44 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;
- (3) un resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena pesada y que corresponde a la posición 45 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y
- 30 (4) un resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena ligera y que corresponde a la posición 50 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

35 Las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y 8 se han mencionado anteriormente para ilustrar un ejemplo más específico de las posiciones de los restos de aminoácido que están sujetas a modificación en la presente divulgación. Por consiguiente, la presente divulgación no se limita a los casos en los que las regiones variables de cadena pesada o las regiones variables de cadena ligera tienen estas secuencias de aminoácidos.

40 Cada uno de los restos de aminoácido de (1) y (2), y (3) y (4) mencionados anteriormente se acercan entre sí durante la asociación tal como se indica en la Fig. 1 y en los siguientes ejemplos. Los expertos en la materia pueden identificar las posiciones correspondientes a los restos de aminoácido anteriormente mencionados de (1) a (4) de las regiones variables de cadena pesada o las regiones variables de cadena ligera que se deseen usando la modelización de homología y como tal, usando los programas informáticos disponibles en el mercado. Una vez identificados, los restos de aminoácido de estas posiciones se pueden modificar apropiadamente.

45 En los anticuerpos mencionados anteriormente, "los restos de aminoácido cargados" se seleccionan preferentemente, por ejemplo, de entre restos de aminoácido incluidos en cualquiera de los siguientes grupos: (a) ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D); y (b) lisina (K), arginina (R) e histidina (H).

50 Además, la presente divulgación proporciona anticuerpos (polipéptidos, heteromultímeros y similares) que tienen regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera, en las que uno cualquiera de los restos de aminoácido del siguiente (3) o (4) es un resto de aminoácido cargado. Las cadenas laterales de los restos de aminoácido indicados en (3) y (4) que se muestran a continuación pueden aproximarse entre sí para formar un núcleo hidrófobo:

- 55 (3) un resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena pesada y que corresponde a la posición 45 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y
- (4) un resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena ligera y que corresponde a la posición 50 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

60 En los anticuerpos mencionados anteriormente, los "restos de aminoácido cargados" son preferentemente, por ejemplo, ácido glutámico (E), ácido aspártico (D), lisina (K), arginina (R) o histidina (H).

65 Por lo general, los restos de aminoácido anteriormente mencionados de (1) a (4) son (1) glutamina (Q), (2) glutamina (Q), (3) leucina (L) y (4) prolina (P), respectivamente, en los seres humanos y ratones. Por lo tanto, en realizaciones preferidas de la presente divulgación, estos restos de aminoácido se someten a modificación (por ejemplo, la sustitución de aminoácidos cargados). Los tipos de los restos de aminoácido anteriormente mencionados de (1) a (4) no se limitan necesariamente a los restos de aminoácido mencionados anteriormente, y pueden ser otros

aminoácidos que correspondan a estos aminoácidos. Por ejemplo, en el caso de los seres humanos, un aminoácido de la región variable de cadena ligera correspondiente a la posición 44 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 puede ser, por ejemplo, histidina (H). Los expertos en la materia puede averiguar el tipo de resto de aminoácido que corresponde a cualquier posición de SEQ ID NO: 8, consultando las publicaciones desveladas y similares (por ejemplo, *J. Mol. Recognit.* 2003; 16:113-120), y pueden modificar adecuadamente estos restos de aminoácido (por ejemplo, la sustitución de aminoácidos cargados).

Los métodos de producción de los anticuerpos mencionados anteriormente, y los métodos de la presente divulgación para la regulación de la asociación que cuentan con la modificación de los restos de aminoácido de (1) a (4) mencionados anteriormente también son realizaciones preferidas de la presente divulgación.

En otra realización, la presente divulgación proporciona métodos de supresión de la asociación entre cadenas pesadas o entre una cadena pesada y una cadena ligera mediante la introducción de la repulsión electrostática a la superficie de contacto de la región constante de cadena pesada o de cadena ligera. Los ejemplos de restos de aminoácido en contacto entre sí en la superficie de contacto de las regiones constantes de cadena pesada incluyen las regiones correspondientes a las posiciones 377 (356) y 470 (439), las posiciones 378 (357) y 393 (370), y las posiciones 427 (399) y 440 (409) en la región CH3. Los ejemplos de restos de aminoácido que entran en contacto entre sí en la superficie de contacto entre una región constante de cadena pesada y una región constante de cadena ligera incluyen regiones correspondientes a la posición 221 (posición 213) de la región CH1 y la posición 123 de la región CL. La numeración en las regiones constantes de anticuerpos se basa en el documento creado por Kabat *et al.* (Kabat EA *et al.* 1991. Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico. NIH), mostrándose la numeración de la UE entre paréntesis para las regiones constantes de cadena pesada.

Como se indica en los siguientes ejemplos, se regulará la asociación de las cadenas pesadas de anticuerpos, y los anticuerpos deseados se pueden obtener preferentemente mediante la modificación de estos restos de aminoácido y la realización de los métodos de la presente divulgación.

Más concretamente, en una realización preferida, la presente divulgación proporciona anticuerpos que tienen dos o más tipos de regiones CH3 de cadena pesada y proteínas de unión a la región Fc (por ejemplo, anticuerpos de tipo IgG, minicuerpos (Alt M *et al.*, *FEBS Letters* 1999; 454:90-94), inmunoadhesina (Documento no de patente 2) y similares), en los que de uno a tres pares de restos de aminoácido de la primera región CH3 de cadena pesada, seleccionados de entre los pares de restos de aminoácido que se indican en (1) a (3) a continuación, portan el mismo tipo de carga:

- (1) restos de aminoácido incluidos en la región CH3 de cadena pesada en las posiciones 356 y 439 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE;
- (2) restos de aminoácido incluidos en la región CH3 de cadena pesada en las posiciones 357 y 370 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE; y
- (3) restos de aminoácido incluidos en la región CH3 de cadena pesada en las posiciones 399 y 409 de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.

En una realización más preferida, la presente divulgación proporciona un anticuerpo en el que de uno a tres pares de los restos de aminoácido de la segunda región CH3 de cadena pesada (i) se seleccionan de entre los pares de restos de aminoácido de (1) a (3) mencionados anteriormente; y (ii) porta una carga opuesta a los restos de aminoácido correspondientes de la primera región CH3 de cadena pesada.

Cada uno de los restos de aminoácido indicados anteriormente en (1) a (3) se aproxima entre sí durante la asociación, como se muestra en la Fig. 27 y en los ejemplos descritos a continuación. Los expertos en la materia pueden averiguar las posiciones correspondientes a los restos de aminoácido anteriormente mencionados de (1) a (3) de una región CH3 de cadena pesada o región constante de cadena pesada deseada mediante modelización por homología y, como tal, usando el programa informático disponible en el mercado, y modificar los restos de aminoácido de estas posiciones apropiadamente.

En los anticuerpos mencionados anteriormente, "los restos de aminoácido cargados" se seleccionan preferentemente, por ejemplo, de restos de aminoácido incluidos en cualquiera de los siguientes grupos: (a) ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D); y (b) lisina (K), arginina (R) e histidina (H).

En los anticuerpos mencionados anteriormente, la expresión "que portan la misma carga" significa, por ejemplo, que la totalidad de los dos o más restos de aminoácido se componen de los restos de aminoácido incluidos en cualquiera de (a) o (b) mencionados anteriormente. La expresión "que portan cargas opuestas" significa, por ejemplo, que al menos uno de los restos de aminoácido, entre dos o más restos de aminoácido, se compone de restos de aminoácido incluidos en uno cualquiera de los grupos de (a) o (b) mencionados anteriormente, y los restos de aminoácido restantes se componen de los restos de aminoácido incluidos en el otro grupo.

En una realización preferida, los anticuerpos mencionados anteriormente pueden tener su primera región CH3 de cadena pesada y su segunda región CH3 de cadena pesada reticuladas por enlaces disulfuro.

En la presente divulgación, los restos de aminoácido sometidos a "modificación" no se limitan a los restos de aminoácido anteriormente mencionados de las regiones variables de anticuerpos o las regiones constantes de anticuerpos. Los expertos en la materia pueden identificar los restos de aminoácido que forman la superficie de contacto, en polipéptidos mutantes o heteromultímeros, usando modelización por homología y como tal, usando el programa informático disponible en el comercio; los restos de aminoácido de estas posiciones se pueden someter a modificaciones para regular la asociación.

Aunque no es obligatorio, los métodos de la presente divulgación se pueden llevar a cabo en combinación con técnicas conocidas. Por ejemplo, además de las "modificaciones" de la presente divulgación para potenciar la asociación entre VH1 y VL1, y/o VH2 y VL2, la sustitución de una cadena lateral de aminoácidos presente en una de las regiones variables de cadena H por una cadena lateral más larga (botón), y la sustitución de la cadena lateral de aminoácidos opuesta presente en la región variable de la otra cadena H por una cadena lateral menor (ojal) potencia la asociación entre VH1 y VL1, y/o VH2 y VL2 de manera que el botón se sitúa en el ojal. Como resultado de ello, se puede suprimir aún más la asociación entre polipéptidos VH1 y VL2, y/o VH2 y VL1.

Los métodos de la presente invención para la regulación de la asociación se pueden llevar a cabo adecuadamente cuando se obtienen preferentemente (eficazmente) sc(Fv)₂s deseados. En lo sucesivo, el caso de sc(Fv)₂ compuesto de dos tipos de regiones variables de cadena pesada (H1 y H2) y dos tipos de regiones variables de cadena ligera (L1 y L2) se describirá como un ejemplo con mayor detalle.

En general, el sc(Fv)₂ es un polipéptido monocatenario en el que dos regiones variables de cadena pesada (VH1 y VH2) y dos regiones variables de cadena ligera (VL1 y VL2) están unidas por enlazadores. Más concretamente, el sc(Fv)₂ es un minicuerpo en el que cuatro regiones variables de anticuerpo se enlazan con un enlazador y similar para producir una sola cadena. Comúnmente, el sc(Fv)₂ es un anticuerpo en el que cuatro regiones variables, dos regiones variables de cadena ligera y dos regiones variables de cadena pesada, están unidas por enlazadores para producir una sola cadena (Hudson *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 1999; 231:177-189).

El sc(Fv)₂ se puede producir mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, mediante la unión de los scFv con enlazadores. El scFv incluye la VH y la VL del anticuerpo, y estas regiones están presentes en una sola cadena polipeptídica (para una revisión sobre los scFv, véase Pluckthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol. 113 (Rosenburg and Moore ed. (Springer Verlag, Nueva York) pág. 269-315, 1994).

Se prefiere un anticuerpo en el que hay dos VH y dos VL dispuestas en el orden de VH, VL, VH, VL ([VH] enlazador [VL] enlazador [VH] enlazador [VL]) partiendo del lado N-terminal de un polipéptido monocatenario.

El orden de las dos VH y las dos VL no se limita en particular a la disposición mencionada anteriormente, y puede estar en cualquier orden, incluyendo, por ejemplo, las siguientes disposiciones.

[VL] enlazador [VH] enlazador [VH] enlazador [VL]
 [VH] enlazador [VL] enlazador [VL] enlazador [VH]
 [VH] enlazador [VH] enlazador [VL] enlazador [VL]
 [VL] enlazador [VL] enlazador [VH] enlazador [VH]
 [VL] enlazador [VH] enlazador [VL] enlazador [VH].

El sc(Fv)₂ también puede incluir secuencias de aminoácidos distintas de las de las regiones variables de los anticuerpos y los enlazadores.

Las regiones variables de los anticuerpos anteriormente mencionados pueden ser regiones variables de longitud completa o secuencias parciales de las regiones variables, siempre que se mantenga la afinidad hacia los antígenos. Además, las secuencias de aminoácidos de las regiones variables pueden contener sustituciones, deleciones, adiciones, inserciones o similares. Por ejemplo, se pueden convertir en anticuerpos quiméricos o humanizados para reducir la antigenicidad.

Se pueden usar enlazadores peptídicos arbitrarios o compuestos enlazadores sintéticos que se pueden introducir por ingeniería genética (por ejemplo, véase lo desvelado en *Protein Engineering*, 9(3), 299-305, 1996) como enlazadores que enlazan las regiones variables de un anticuerpo, pero se prefieren los enlazadores peptídicos de la presente divulgación. La longitud de los enlazadores peptídicos no se limita a una en particular, y puede seleccionarse adecuadamente de acuerdo con el fin por los expertos en la materia. La longitud es preferentemente de doce aminoácidos o más (sin límite superior en concreto, normalmente de 30 aminoácidos o menos, y preferentemente, de 20 aminoácidos o menos), y particularmente preferentemente de 15 aminoácidos. Cuando se incluyen tres enlazadores peptídicos en el sc(Fv)₂, todos los enlazadores peptídicos usados pueden tener la misma longitud, o se pueden usar enlazadores peptídicos de diferentes longitudes.

Los ejemplos de enlazadores peptídicos incluyen:

Ser

Gly·Ser

Gly·Gly·Ser

Ser·Gly·Gly

Gly·Gly·Gly·Ser

Ser·Gly·Gly·Gly

Gly·Gly·Gly·Gly·Ser

Ser·Gly·Gly·Gly·Gly

Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Ser

Ser·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly

Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Ser

Ser·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly

(Gly·Gly·Gly·Gly·Ser)_n

(Ser·Gly·Gly·Gly·Gly)_n

[donde n es un número entero de 1 o superior]. Sin embargo, la longitud y la secuencia de los enlaces peptídicos pueden ser seleccionadas adecuadamente de acuerdo con el fin por los expertos en la materia.

5 Las realizaciones preferidas de sc(Fv)₂ incluyen, por ejemplo, el siguiente sc(Fv)₂: [VH] enlazador peptídico (15 aminoácidos) [VL] enlazadores peptídicos (15 aminoácidos) [VH] enlazadores peptídicos (15 aminoácidos) [VL].

10 Los enlazadores sintéticos (agentes de reticulación químicos) que se pueden usar incluyen los agentes de reticulación que se usan rutinariamente para reticular péptidos, por ejemplo, *N*-hidroxisuccinimida (NHS), suberato de disuccinimidilo (DSS), suberato de bis(succinimidilo) (BS³), ditiobis(propionato de succinimidilo) (DSP), ditiobis(propionato de succinimidilo) (DTSSP), bis(succinato de succinimidilo) de etilenglicol (EGS), bis(succinato de sulfosuccinimidilo) de etilenglicol (sulfo-EGS), tartrato de disuccinimidilo (DST), tartrato de disulfosuccinimidilo (sulfo-DST), bis[2-(succinimidoxicarbonilo)etil]sulfona (BSOCOES) y bis[2-(succinimidoxicarbonilo)etil]sulfona (sulfo-BSOCOES). Estos agentes de reticulación se encuentran disponibles en el comercio.

Normalmente, para unir cuatro regiones variables de anticuerpo entre sí se requieren tres enlazadores, y los enlazadores que se van a usar pueden ser todos del mismo tipo o de tipos diferentes.

20 Además, como isómeros conformacionales de sc(Fv)₂, existen, por ejemplo, el tipo diacuerpo monocatenario y el tipo scFv bivalente.

25 Cuando la disposición de sc(Fv)₂ está en el orden [región variable 1] (enlazador 1) [región variable 2] (enlazador 2) [región variable 3] (enlazador 3) [región variable 4], el tipo scFv bivalente, en la presente invención, se refiere a sc(Fv)₂ que tiene una estructura en la que la región variable 1 y la región variable 2 están asociadas, y en la que la región variable 3 y la región variable 4 están asociadas. En la presente invención, tipo diacuerpo monocatenario se refiere a sc(Fv)₂ que tiene una estructura en la que la región variable 1 y la región variable 4 están asociadas, y en la que la región variable 2 y la región variable 3 están asociadas.

30 Un ejemplo de diacuerpo monocatenario es un sc(Fv)₂ que tiene la estructura mostrada a la derecha en la Fig. 12(b), y un ejemplo de un tipo scFv bivalente es un sc(Fv)₂ que tiene la estructura mostrada a la izquierda en la Fig. 12(b).

35 Es posible analizar si un sc(Fv)₂ tiene una estructura de tipo diacuerpo monocatenario o una estructura de tipo scFv bivalente, por ejemplo, mediante proteólisis limitada a la proteasa. Por ejemplo, el análisis puede llevarse a cabo mediante un método tal como el siguiente.

La proteólisis limitada de un sc(Fv)₂ de ensayo se lleva a cabo usando subtilisina A, un tipo de proteasa que puede degradar parcialmente y de forma restrictiva las partes enlazadoras de un sc(Fv)₂.

40 Cuando el sc(Fv)₂ es el tipo diacuerpo monocatenario, independientemente de qué enlazador de los tres enlazadores poseídos por el sc(Fv)₂ se escinde, el peso molecular aparente no cambiará debido a la interacción

entre la VH y la VL.

Por otra parte, cuando el sc(Fv)₂ es un tipo scFv bivalente, se producirán especies moleculares que tendrán la mitad del peso molecular original cuando se escinda el enlazador central.

5 Por lo tanto, el tipo scFv bivalente y el tipo diacuerpo monocatenario se pueden diferenciar mediante el análisis de los productos de reacción.

10 Los productos de reacción se pueden analizar, por ejemplo, mediante cromatografía de filtración en gel. Además, usando la cromatografía, las proporciones de sc(Fv)₂ bivalente y las conformaciones de diacuerpo monocatenario presentes en sc(Fv)₂ se pueden evaluar cuantitativamente basándose en las áreas de los picos.

15 Los métodos de la presente invención para la regulación de la asociación se pueden usar convenientemente para el sc(Fv)₂ anteriormente mencionado cuando se desee obtener preferentemente la forma deseada, es decir, bien una forma de diacuerpo monocatenario o una forma de scFv bivalente.

20 Más concretamente, cuando sc(Fv)₂ tiene la estructura VH1-(enlazador)-VL1-(enlazador)-VH2-(enlazador)-VL2, y se desea obtener preferentemente el sc(Fv)₂ de tipo scFv bivalente usando los métodos de la presente invención para la regulación de la asociación, no es necesario suprimir la asociación, por ejemplo, entre VH1 y VL2, y/o VH2 y VL1 (por ejemplo, se introducen mutaciones de modo que los restos de aminoácido que forman la superficie de contacto entre VH1 y VL2 porten el mismo tipo de carga).

25 Como alternativa, cuando se desee obtener preferentemente el sc(Fv)₂ de tipo diacuerpo monocatenario, solo es necesario inhibir la asociación, por ejemplo, entre VH1 y VL1, y/o VH2 y VL2 (por ejemplo, las mutaciones se introducen de manera que los restos de aminoácido que forman la superficie de contacto entre VH1 y VL1 porten el mismo tipo de cargas).

30 La presente invención también puede llevarse a cabo de manera similar cuando el sc(Fv)₂ sea un anticuerpo monoespecífico.

Además de estas técnicas, cada uno de los dominios VH y VL puede ser reticulado por enlaces disulfuro (*Clin. Cancer Res.* Febrero de 1996; 2(2):245-52).

35 Los métodos de la presente divulgación para la regulación de la asociación permiten, por ejemplo, la producción eficaz de anticuerpos o polipéptidos que están activos. Los ejemplos de dichas actividades incluyen la actividad de unión, la actividad neutralizante, la actividad citotóxica, la actividad agonista, la actividad antagonista y la actividad enzimática, y similares. La actividad agonista es una actividad que induce algún tipo de cambio en la actividad fisiológica a través de la unión de un anticuerpo a un antígeno, tal como un receptor, que provoca la transducción de señales o similar en las células. Los ejemplos de la actividad fisiológica incluyen la actividad de crecimiento, la actividad de supervivencia, la actividad de diferenciación, la actividad de transcripción, la actividad de transporte de membrana, la actividad de unión, la actividad proteolítica, la actividad de fosforilación/desfosforilación, la actividad redox, la actividad de transferencia, la actividad nucleolítica, la actividad de deshidratación, la actividad de inducción de la muerte celular y la actividad de inducción de la apoptosis y similar, pero sin limitarse a las mismas.

45 Los anticuerpos o polipéptidos que reconocen los antígenos deseados o que se unen a los receptores deseados se pueden producir de manera eficaz mediante los métodos descritos en el presente documento.

50 Los antígenos no se limitan a uno en particular, pudiéndose usar cualquier tipo de antígeno. Los ejemplos de antígenos incluyen receptores o sus fragmentos, antígenos del cáncer, antígenos del MHC y antígenos de diferenciación y similares, pero no se limitan en particular a los mismos.

55 Los ejemplos de receptores incluyen receptores que pertenecen a la familia de receptores de factor hematopoyético, familia de receptores de citocinas, familia de receptores de tipo tirosina quinasa, familia de receptores de tipo serina/treonina quinasa, familia de receptores de TNF, familia de receptores acoplados a la proteína G, familia de receptores anclados a GPI, familia de receptores de tipo tirosina fosfatasa, familia de factores de adhesión, familia de receptores de hormonas, y similares. Se pueden encontrar informes sobre los receptores que pertenecen a estas familias de receptores y sus características en varias fuentes documentales, por ejemplo, en Cooke B. A., King R. J. B., van der Molen H. J. ed. *New Comprehensive Biochemistry* vol.18B "Hormones and their Actions Part II" pág.1-46 (1988) Elsevier Science Publishers BV., Nueva York, EE.UU.; Patthy L. (1990) *Cell*, 61:13-14; Ullrich A., et al. (1990) *Cell*, 61: 203-212; Massagui J. (1992) *Cell*, 69: 1067-1070; Miyajima A., et al. (1992) *Annu. Rev. Immunol.*, 10: 295-331; Taga T. y Kishimoto T. (1992) *FASEB J.* 7: 3387-3396; Fantl Wl., et al. (1993) *Annu. Rev. Biochem.*, 62: 453-481; Smith C. A., et al. (1994) *Cell*, 76: 959-962; Flower D. R. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, 1422: 207-234; Miyasaka M. ed. *Cell Technology*, Handbook Series "Handbook for adhesión factors" (1994) Shujunsha, Tokyo, Japón; y similares. Los ejemplos de receptores específicos que pertenecen a las familias de receptores mencionadas anteriormente incluyen el receptor de la eritropoyetina humano o de ratón (EPO), el receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos humano o de ratón (G-CSF), el receptor de la trombopoyetina humano o de

ratón (TPO), el receptor de la insulina humano o de ratón o el receptor del ligando Flt-3 humano o de ratón, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas humano o de ratón (PDGF), el receptor del interferón (IFN)- α y - β humano o de ratón, el receptor de leptina humano o de ratón, el receptor de la hormona de crecimiento humano o de ratón (GH), el receptor de la interleucina (IL)-10 humano o de ratón, el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)-I humano o de ratón, el receptor del factor inhibidor de la leucemia humano o de ratón (LIF) y el receptor del factor neurotrófico ciliar humano o de ratón (CNTF) (hEPOR: Simon, S. *et al.* (1990) *Blood* 76, 31-35; mEPOR: D'Andrea, A. D. *et al.*, (1989) *Cell* 57, 277-285; hG-CSFR: Fukunaga, R. *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 87, 8702-8706; mG-CSFR: Fukunaga, R. *et al.*, (1990) *Cell* 61, 341-350; hTPOR: Vigon, I. *et al.*, (1992) 89, 5640-5644; mTPOR: Skoda, R. C. *et al.*, (1993) 12, 2645-2653; hlnsR: Ullrich, A. *et al.*, (1985) *Nature* 313, 756-761; hFlt-3: Small, D. *et al.*, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91, 459-463; hPDGFR: Gronwald, R. G. K. *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85, 3435-3439; hIFN α/β R: Uze, G. *et al.*, (1990) *Cell* 60, 225-234; y Novick, D. *et al.* (1994) *Cell* 77, 391-400).

Los antígenos del cáncer son antígenos que se expresan como células que se vuelven malignas, y también se denominan antígenos específicos del tumor. Por otra parte, las cadenas de azúcar anómalas que aparecen en la superficie de las células y las moléculas de proteína cuando las células se vuelven cancerosas también son antígenos del cáncer, y se denominan, en particular, antígenos de hidrato de carbono asociados a carcinomas. Los ejemplos de antígenos del cáncer incluyen CA19-9, CA15-3 y sialil SSEA-1 (SLX).

Los antígenos del MHC se pueden clasificar a grandes rasgos en los antígenos del MHC de clase I y los antígenos del MHC de clase II: los antígenos del MHC de clase I incluyen HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G y -H; y los antígenos del MHC de clase II incluyen HLA-DR, -DQ y -DP.

Los antígenos de diferenciación incluyen CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15s, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD32, CD33, CD34, CD35, CD38, CD40, CD41a, CD41b, CD42a, CD42b, 35 CD43, CD44, CD45, CD45RO, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD51, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD64, CD69, CD71, CD73, CD95, CD102, CD106, CD122, CD126 y CDw130.

La presente divulgación también proporciona polipéptidos o heteromultímeros mutantes cuya asociación se regula mediante los métodos descritos en el presente documento. Más concretamente, la presente divulgación se refiere a polipéptidos o heteromultímeros que se obtienen mediante métodos de la presente divulgación para la regulación de las asociaciones.

Las realizaciones preferidas de la presente divulgación proporcionan polipéptidos mutantes que tienen modificaciones realizadas en los restos de aminoácido que forman la superficie de contacto de los polipéptidos originales para inhibir la asociación dentro de los polipéptidos.

Otras realizaciones de la presente divulgación proporcionan heteromultímeros que tienen modificaciones realizadas en los restos de aminoácido que forman la superficie de contacto entre los polipéptidos originales, de modo que se inhibe la asociación entre los polipéptidos.

En la presente divulgación, la expresión "polipéptidos originales" se refiere a polipéptidos en el estado previo a la modificación mediante los métodos de la presente divulgación en los que se regula la asociación.

Un ejemplo de los polipéptidos mutantes anteriormente mencionados de la presente divulgación es un mutante en el que el polipéptido original puede formar dos tipos de isómeros conformacionales. Por otra parte, un ejemplo de los heteromultímeros anteriormente mencionados es un multímero en el que el polipéptido original puede formar dos o más tipos de multímeros.

También se incluyen en la presente divulgación los polipéptidos o heteromultímeros mutantes cuya asociación se regula mediante los métodos anteriormente mencionados de la presente divulgación para la regulación de la asociación. Más concretamente, en realizaciones preferidas de los métodos descritos anteriormente para la regulación de la asociación, un polipéptido o heteromultímero cuya asociación se regula también es una realización preferida de la presente divulgación.

La presente divulgación también proporciona métodos de producción de polipéptidos o heteromultímeros en los que se regula la asociación de los polipéptidos o heteromultímeros.

Las realizaciones preferidas de los métodos de producción de la presente divulgación proporcionan métodos de producción de polipéptidos que tienen mutaciones en los restos de aminoácido que forman la superficie de contacto en los polipéptidos, de modo que se regula la asociación del polipéptido, en las que los métodos de producción de los polipéptidos mutantes incluyen las etapas de:

(a) modificar ácidos nucleicos que codifican los restos de aminoácido que forman una superficie de contacto de los polipéptidos a partir de los ácidos nucleicos originales, para inhibir la asociación en los polipéptidos;

- (b) cultivar células hospedadoras de manera que se expresen estos ácidos nucleicos; y
- (c) extraer los polipéptidos del cultivo de células hospedadoras.

En otras realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos de producción de heteromultímeros cuyos restos de aminoácido que forman la superficie de contacto entre los polipéptidos tienen mutaciones que permiten la regulación de la asociación de los heteromultímeros, en las que los métodos de producción de heteromultímeros incluyen las etapas de:

- (a) modificar ácidos nucleicos que codifican los restos de aminoácido que forman una superficie de contacto entre los polipéptidos a partir de los ácidos nucleicos originales, para inhibir la asociación entre los polipéptidos;
- (b) cultivar células hospedadoras de manera que se expresen estos ácidos nucleicos; y
- (c) extraer los heteromultímeros del cultivo de células hospedadoras.

Un método que incluye la etapa de usar los métodos descritos anteriormente de la presente divulgación para la regulación de la asociación con el fin de modificar ácidos nucleicos que codifiquen restos de aminoácido que forman la superficie de contacto de (entre) polipéptidos a partir de los ácidos nucleicos originales, de manera que se inhiba la asociación del polipéptido también es una realización preferida de los métodos de producción anteriormente mencionados de la presente divulgación.

La expresión "modificar ácidos nucleicos" en los métodos anteriormente mencionados de la presente divulgación se refiere a la modificación de los ácidos nucleicos de modo que correspondan a restos de aminoácido introducidos mediante las "modificaciones" de la presente divulgación. Más concretamente, se refiere a la modificación de los ácidos nucleicos que codifican los restos de aminoácido (antes de su modificación) originales en los ácidos nucleicos que codifican los restos de aminoácido que se van a introducir mediante la modificación. Normalmente, esto significa la realización de las manipulaciones de genes o del tratamiento de mutación que daría lugar a al menos una inserción, supresión o sustitución de nucleótido en el ácido nucleico original, de modo que se formen los codones que codifican restos de aminoácido de interés. Más concretamente, los codones que codifican los restos de aminoácidos originales se sustituyen con codones que codifican los restos de aminoácido que han de ser introducidos mediante la modificación. Dicha modificación de ácido nucleico puede ser realizada de forma adecuada por los expertos en la materia usando técnicas conocidas tales como mutagénesis específica de sitio y mutagénesis por PCR.

Además, los ácidos nucleicos de la presente divulgación normalmente son portados por (están insertados en) vectores adecuados y después se introducen en células hospedadoras. Estos vectores no se limitan a uno en particular, siempre que el ácido nucleico insertado se mantenga de forma estable. Por ejemplo, cuando se usa *E. coli* como hospedador, el vector de clonación es preferentemente un vector pBluescript (Stratagene) y similar, pero se pueden usar varios vectores disponibles en el mercado. Los vectores de expresión son particularmente útiles como vectores para la producción de los polipéptidos descritos en el presente documento. Los vectores de expresión no se limitan a uno en particular, siempre que puedan expresar polipéptidos en tubos de ensayo, *E. coli*, células cultivadas u organismos individuales. Por ejemplo, los vectores preferidos incluyen el vector pBEST (Promega) para la expresión en tubos de ensayo, el vector pET (Invitrogen) para *E. coli*, el vector pME18S-FL3 (n.º de acceso del GenBank AB009864) para las células cultivadas y el vector pME18S (*Mol. Cell Biol.* 8:466-472 (1998)) para organismos individuales. La inserción de un ADN de la presente divulgación en vectores puede realizarse mediante métodos convencionales tales como las reacciones de ligasa usando sitios de enzimas de restricción ("Current protocols in Molecular Biology", edit. Ausubel *et al.* (1987) Publish. John Wiley & Sons. Sección 11.4-11.11).

Las células hospedadoras mencionadas anteriormente no se limitan a una en particular, y se pueden usar varias células hospedadoras, dependiendo del fin. Las células usadas para expresar los polipéptidos incluyen células bacterianas (por ejemplo, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *E. Coli*, *Streptomyces* y *Bacillus subtilis*), células fúngicas (por ejemplo, levaduras y *Aspergillus*), células de insectos (por ejemplo, *Drosophila* S2 y *Spodoptera* SF9), células animales (por ejemplo, CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK293 y células de melanoma de Bowes), y células vegetales. Se pueden introducir vectores en células hospedadoras usando métodos conocidos tales como el método de precipitación en fosfato de calcio, método de electroporación ("Current protocols in Molecular Biology", edit. Ausubel *et al.* (1987) Publish. John Wiley & Sons. Sección 9.1-9.9), método de lipofección (GIBCO-BRL) y método de microinyección.

Para secretar polipéptidos expresados en células hospedadoras en la luz del retículo endoplasmático, espacio periplasmático o entorno extracelular, se pueden incorporar señales de secreción adecuadas a los polipéptidos de interés. Estas señales pueden ser intrínsecas o exógenas para los polipéptidos de interés.

Cuando los polipéptidos de la presente divulgación se secretan en el medio de cultivo, los polipéptidos producidos mediante el método mencionado anteriormente se pueden recoger extrayendo el medio. Cuando los polipéptidos de la presente divulgación se producen dentro de células, en primer lugar, se lisan las células, y a continuación, se recogen estos polipéptidos.

Los polipéptidos de la presente divulgación se pueden recoger y purificar de cultivos celulares recombinantes usando métodos conocidos, incluyendo precipitación en sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía con fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxapatita y cromatografía con lectina.

5 La presente divulgación se refiere a composiciones (agentes farmacéuticos), a compuestos de un polipéptido o a un heteromultímero mutante de la presente divulgación y a un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 En la presente divulgación, las composiciones farmacéuticas normalmente se refieren a los agentes farmacéuticos para tratar o evitar, o ensayar y diagnosticar enfermedades.

15 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden formular mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, dichas composiciones farmacéuticas se pueden usar por vía parenteral, como inyecciones que son soluciones o suspensiones estériles que incluyen un anticuerpo junto con agua u otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, dichas composiciones se pueden formular como dosis unitarias que cumplen los requisitos para la preparación de productos farmacéuticos combinando de forma apropiada el anticuerpo con medios o vehículos farmacéuticamente aceptables, concretamente con agua estéril, solución salina fisiológica, un aceite vegetal, emulsionante, suspensión, detergente, estabilizante, agente saborizante, excipiente, vehículo, conservante, aglutinante o similares. En dichas preparaciones, la cantidad de principio activo se ajusta de modo que la dosis en encuentre dentro de un intervalo apropiadamente predeterminado.

20 Se pueden formular composiciones estériles para inyección usando vehículos tales como agua destilada para inyección, de acuerdo con protocolos de formulación convencionales.

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

30 Los aceites incluyen aceites de sésamo y de soja. Se pueden usar benzoato de bencilo y/o alcohol bencílico en combinación como solubilizantes. También se pueden combinar tampones (por ejemplo, tampón fosfato y tampón acetato de sodio), lenitivos (por ejemplo, clorhidrato de procaína), estabilizantes (por ejemplo, alcohol bencílico y fenol) y/o antioxidantes. En general, las inyecciones preparadas se cargan en ampollas apropiadas.

35 Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, se administran preferentemente por vía parenteral. Por ejemplo, las composiciones pueden ser inyecciones, composiciones transnasales, composiciones transpulmonares o composiciones transdérmicas. Por ejemplo, dichas composiciones se pueden administrar por vía sistémica o local por inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, o similares.

40 Los métodos de administración se pueden seleccionar de forma apropiada considerando la edad y los síntomas del paciente. La dosis de una composición farmacéutica compuesta de un anticuerpo o un polinucleótido que codifica un anticuerpo puede ser, por ejemplo, de 0,0001 a 1.000 mg/kg para cada administración. De forma alternativa, la dosis puede ser, por ejemplo, de 0,001 a 100.000 mg por paciente. Sin embargo, las dosis no se limitan a los intervalos descritos anteriormente. Las dosis y los métodos de administración varían dependiendo del peso, de la edad y de los síntomas de un paciente, y similares. Los expertos en la materia pueden seleccionar las dosis y los métodos de administración apropiados considerando los factores descritos anteriormente.

50 Los polipéptidos o heteromultímeros descritos en el presente documento se pueden formular mediante la combinación con otros componentes farmacéuticos cuando sea necesario.

La presente divulgación también proporciona ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos mutantes de la presente divulgación o los heteromultímeros de la presente divulgación. Además, los vectores que portan estos ácidos nucleicos también se incluyen en la presente divulgación.

55 La presente divulgación proporciona células hospedadoras que portan los ácidos nucleicos descritos anteriormente. Las células hospedadoras no se limitan a una en particular, e incluyen, por ejemplo, células de *E. Coli* y de diversos animales. Las células hospedadoras se pueden usar, por ejemplo, como sistema de producción para producir y expresar los anticuerpos o los polipéptidos de la presente divulgación. Hay sistemas de producción *in vitro* e *in vivo* disponibles para los sistemas de producción de polipéptidos. Los sistemas de producción que usan células eucariotas o células procariotas son ejemplos de sistemas de producción *in vitro*.

60 Las células eucariotas que se pueden usar como célula hospedadora incluyen, por ejemplo, células animales, células vegetales y células fúngicas. Las células animales incluyen: células de mamífero tales como CHO (*J. Exp. Med.* (1995)108: 945), COS, 3T3, mieloma, BHK (riñón de cría de hámster), HeLa y Vero; células de anfibios tales como ovocitos de *Xenopus laevis* (Valle, *et al.* (1981) *Nature* 291: 338-340); y células de insecto (por ejemplo, Sf9,

Sf21 y Tn5). En la expresión de los anticuerpos descritos en el presente documento, se pueden usar de forma adecuada CHO-DG44, CHO-DX11B, células COS7 y células BHK. Entre las células animales, se prefieren en particular las células CHO para la expresión a gran escala. Se pueden introducir vectores en una célula hospedadora mediante, por ejemplo, métodos con fosfato de calcio, métodos con DEAE-dextrano, métodos que usan liposomas catiónicos-DOTAP (Boehringer-Mannheim), métodos de electroporación o métodos de lipofección.

Las células vegetales incluyen, por ejemplo, células derivadas de *Nicotiana tabacum* conocidas como un sistema de producción de proteínas. Se pueden cultivar callos a partir de estas células para producir los anticuerpos de la presente divulgación. Los sistemas de producción de proteínas conocidos son los que usan células fúngicas incluyendo células de levadura, por ejemplo, células del género *Saccharomyces* (tal como *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pombe*); y células de hongos filamentosos, por ejemplo, género *Aspergillus* tal como *Aspergillus niger*. Estas células se pueden usar como hospedadoras para producir los anticuerpos de la presente divulgación.

Se pueden usar células bacterianas en sistemas de producción procariotas. Los ejemplos de células bacterianas incluyen *Bacillus subtilis*, así como *E. Coli* descritos anteriormente. Se pueden usar dichas células para producir los anticuerpos descritos en el presente documento.

Cuando se produce un anticuerpo usando una célula hospedadora de la presente divulgación, el polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente divulgación se puede expresar cultivando las células hospedadoras transformadas con un vector de expresión que contiene el polinucleótido. El cultivo se puede realizar usando métodos conocidos. Por ejemplo, cuando se usan células animales como hospedadoras, se pueden usar DMEM, MEM, RPMI 1640 o IMDM como medio de cultivo, y se pueden usar con o sin complementos de suero tales como FBS o suero bovino fetal (FCS). También se aceptan cultivos exentos de suero. El pH preferido es de aproximadamente 6 a 8 durante el cultivo. La incubación normalmente se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 30 a 40 °C durante aproximadamente de 15 a 200 horas. El medio se intercambia, se airea y se agita, si es necesario.

Por otra parte, se pueden usar sistemas de producción que usan hospedadores animales o vegetales como sistemas de producción de polipéptidos *in vivo*. Por ejemplo, se introduce un polinucleótido de interés en un animal o en una planta y se produce el polipéptido en el cuerpo del animal o de la planta, y después se recoge. Los "hospedadores" de la presente divulgación incluyen dichos animales y dichas plantas.

Los animales que se van a usar para los sistemas de producción incluyen mamíferos e insectos. Se pueden usar mamíferos tales como cabras, cerdos, ovejas ratones y vacas (Vicki Glaser SPECTRUM Biotechnology Applications (1993)). De forma alternativa, los mamíferos pueden ser animales transgénicos.

Por ejemplo, se puede preparar un polinucleótido que codifique un anticuerpo de la presente divulgación como un gen de fusión con un gen que codifique un polipéptido producido específicamente en la leche, tal como el gen β -caseína de cabra. Se inyectan fragmentos de polinucleótidos que contienen el gen de fusión en embriones de cabra, que a continuación se vuelven a introducir en cabras hembra. Se puede obtener el anticuerpo deseado a partir de leche producida por las cabras transgénicas nacidas de las cabras que recibieron los embriones, o de sus crías. Se pueden administrar hormonas apropiadas para aumentar el volumen de leche que contiene el anticuerpo producido por las cabras transgénicas (Ebert *et al.*, *Bio/Technology* 12: 699-702 (1994)).

También se pueden usar insectos tales como gusanos de seda para producir los anticuerpos de la presente divulgación. Se pueden usar baculovirus que porten un polinucleótido que codifique un anticuerpo de interés para infectar gusanos de seda, y se puede obtener el anticuerpo de interés de los fluidos corporales (Susumu *et al.*, *Nature* 315: 592-594 (1985)).

Las plantas usadas para producir los anticuerpos de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, el tabaco. Cuando se usa el tabaco, se inserta un polinucleótido que codifica un anticuerpo de interés en un vector de expresión vegetal, por ejemplo, pMON 530, y a continuación, el vector se introduce en una bacteria tal como *Agrobacterium tumefaciens*. A continuación, se usan las bacterias para infectar el tabaco tal como *Nicotiana tabacum*, y se pueden obtener los anticuerpos deseados de las hojas (Ma *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24: 131-138 (1994)).

Se puede aislar el anticuerpo resultante del interior o del exterior (tal como el medio y la leche) de células hospedadoras, y purificarse como un anticuerpo homogéneo y esencialmente puro. Los métodos no se limitan a un método específico y se puede usar cualquier método convencional de aislamiento y purificación de anticuerpos. Los anticuerpos se pueden aislar y purificar, seleccionando una combinación apropiada de, por ejemplo, columnas de cromatografía, filtración, ultrafiltración, desalado, precipitación con disolvente, extracción con disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, isoelectroenfoque, diálisis, recristalización y otros.

Las cromatografías incluyen, por ejemplo, cromatografías de afinidad, cromatografías de intercambio iónico, cromatografías hidrófobas, filtraciones en gel, cromatografías en fase inversa y cromatografías de adsorción

(“Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual”. Ed Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Estas cromatografías se pueden llevar a cabo usando cromatografías de fase líquida tales como HPLC y FPLC. Los ejemplos de columnas de cromatografía de afinidad incluyen columnas de proteína A y columnas de proteína G. Los ejemplos de las columnas de proteína A incluyen Hyper D, POROS y Sepharose F. F. (Farmacia).

Se puede modificar libremente un anticuerpo y se pueden eliminar partes peptídicas del mismo tratando el anticuerpo con una enzima modificadora de proteínas apropiada antes o después de la purificación del anticuerpo, si es necesario. Dichas enzimas modificadoras de proteínas incluyen, por ejemplo, tripsinas, quimotripsinas, lisil endopeptidasas, proteína quinasas y glucosidasas.

En otra realización preferida, la presente divulgación también incluye métodos de producción de los polipéptidos o heteromultímeros mutantes de la presente divulgación, incluyendo dichos métodos las etapas de cultivar las células hospedadoras de la presente divulgación como se ha descrito anteriormente y extraer los polipéptidos de dichos cultivos celulares.

Ejemplos

A continuación, en el presente documento, se describirá la presente invención concretamente con referencia a los Ejemplos.

Ejemplo 1. Producción de anticuerpos no neutralizantes contra el Factor IXa (F.IXa)

1-1. Inmunización y producción de hibridomas

Se inmunizaron ocho ratones BALB/c (macho, comenzando la inmunización a las 6 semanas de vida, Japan Charles River) y 5 ratones MRL/lpr (macho, comenzando la inmunización a las 6 semanas de vida, Japan Charles River) como se describe a continuación con el Factor IXa β (Enzyme Research Laboratories, Inc.). Se administró Factor IXa β emulsionado en FCA (adyuvante completo de Freund H37 Ra (Difco Laboratories)) por vía subcutánea a 40 μ g/cabeza como inmunización primaria. Dos semanas más tarde, se administró Factor IXa β emulsionado en FIA (adyuvante incompleto de Freund (Difco Laboratories)) por vía subcutánea a 40 μ g/cabeza. Tras ello, se administraron refuerzos a intervalos de una semana, un total de 3 a 7 veces. Tras confirmarse la elevación del título de anticuerpos en suero contra el Factor IXa β mediante ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas) mostrado en 1-2, se administró Factor IXa β diluido en PBS(-) (solución salina tamponada con fosfato que no contiene iones de calcio ni iones de magnesio), por vía intravenosa a 40 μ g/cabeza. Tres días después de la inmunización final, se fusionaron células de bazo de ratón y células de mieloma de ratón P3X63Ag8U.1 (denominadas P3U1, ATCC CRL-1597), siguiendo procedimientos convencionales usando PEG1500 (Roche Diagnostics). Se realizó el cultivo selectivo de los hibridomas sembrando células fusionadas suspendidas en medio RPMI1640 (Invitrogen) que contenía FBS al 10 % (Invitrogen) (denominado en lo sucesivo en el presente documento FBS al 10 %/RPMI1640) en una placa de cultivo de 96 pocillos y sustituyendo el medio con medio de selección HAT (FBS al 10 %/RPMI1640/HAT al 2 % concentrado 50 veces (Dainippon Pharmaceutical)/BM-Condimed H1 al 5 % (Roche Diagnostics)) 1, 2, 3 y 5 días después de la fusión. Los hibridomas que tenían una actividad de unión al Factor IXa se seleccionaron usando el sobrenadante de cultivo recogido el día 8 o 9 después de la fusión y midiendo la actividad de unión contra el Factor IXa por ELISA que se muestra en 1-2. A continuación, se seleccionaron los hibridomas que no tenían actividad neutralizante contra el Factor IXa midiendo la capacidad del hibridoma para neutralizar la actividad enzimática del Factor IXa, de acuerdo con el método mostrado en 5-3. Los hibridomas se clonaron con dos series de dilución limitante, sembrando las células en una placa de cultivo de 96 pocillos a una célula por pocillo para establecer el hibridoma XB12 que producía anticuerpos anti-Factor IXa.

1-2. ELISA del Factor IXa

Se dispensó Factor IXa β diluido a 1 μ g/ml con tampón de recubrimiento (bicarbonato de sodio 100 mM, pH 9,6, azida de sodio al 0,02 %) en placa Nunc-Immuno (placas Nunc-ImmunoTM96 MicroWellTM MaxiSorpTM (Nalge Nunc International)) a 100 μ l/pocillo y, a continuación, se incubaron durante la noche a 4 °C. Tras tres lavados con PBS (-) que contenía Tween® 20, la placa se bloqueó con tampón diluyente (Tris-HCl 50 mM, pH 8,1, albúmina de suero bovino al 1 %, MgCl₂ 1 mM, NaCl 0,15 M, Tween® 20 al 0,05 %, azida de sodio al 0,02 %) a temperatura ambiente durante dos horas. Tras la eliminación del tampón, a la placa se añadió sobrenadante de cultivo de hibridoma o anti-suero de ratón diluido en el tampón diluyente a 100 μ l/pocillo y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. La placa se lavó tres veces, después se añadió IgG anti-ratón de cabra marcada con fosfatasa alcalina (H + L) (Zymed Laboratories) diluida a 1/2.000 con el tampón diluyente a 100 μ l/pocillo. Se incubó esto a temperatura ambiente durante una hora. La placa se lavó seis veces, se añadió sustrato cromogénico Blue-PhosTM Phosphate Substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories) a 100 μ l/pocillo, y después se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Tras añadir solución de parada Blue-PhosTM (Kirkegaard & Perry Laboratories) a 100 μ l/pocillo, se midió la absorbancia a 595 nm con un lector de microplaca Modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories).

1-3. Mediciones de la actividad neutralizante del Factor IXa

Se disolvió fosfolípido (Sigma-Aldrich) en agua destilada para inyección, y después se sometió a ultrasonido para preparar una solución de fosfolípido a 400 µg/ml. Se mezclaron 40 µl de solución salina tamponada con Tris que contenía albúmina de suero bovino al 0,1 % (denominada en lo sucesivo en el presente documento TBSB), 10 µl de Factor IXaβ a 30 ng/ml (Enzyme Research Laboratories), 5 µl de solución de fosfolípido a 400 µg/ml, 5 µl de TBSB que contenía CaCl₂ 100 mM y MgCl₂ 20 mM y 10 µl de sobrenadante de cultivo de hibridoma en una placa de 96 pocillos, y después se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Se añadieron 20 µl de Factor X a 50 mg/ml (Enzyme Research Laboratories) y 10 µl de 3U/ml de Factor VIIIa (American Diagnostica) a esta solución mixta, y después se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 10 µl de EDTA 0,5 M para detener la reacción. Se añadieron cincuenta µl de solución S-2222 (Chromogenix) a la solución de reacción, que después se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, seguido de la medición de la absorbancia a la longitud de onda de medición de 405 nm y la longitud de onda de control de 655 nm en un modelo lector de microplacas 3550 (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Ejemplo 2. Producción de anticuerpos no neutralizantes contra el Factor X (F.X)

2-1. Inmunización y preparación de hibridomas

Se inmunizaron ocho ratones BALB/c (macho, comenzando la inmunización a las 6 semanas de vida, Japan Charles River) y 5 ratones MRL/lpr (macho, comenzando la inmunización a las 6 semanas de vida, Japan Charles River) con el Factor X (Enzyme Research Laboratories, Inc.) como se describe a continuación. Para la inmunización inicial, se administró Factor X emulsionado en FCA por vía subcutánea a 40 µg/cabeza. Dos semanas más tarde, se administró Factor X emulsionado en FIA por vía subcutánea a 20 o 40 µg/cabeza. Tras ello, se administró un total de 3 a 6 refuerzos a intervalos de una semana. Tras confirmarse la elevación del título de anticuerpos en suero contra el factor X mediante ELISA como se describe en 2-2, se administró factor X diluido en PBS(-) por vía intravenosa a 20 o 40 µg/cabeza como inmunización final. Tres días después de la inmunización final, se fusionaron células de bazo de ratón con células de mieloma de ratón P3U1 de acuerdo con un método convencional usando PEG1500. Se sembraron las células fusionadas suspendidas en medio de FBS al 10 %/RPMI1640 en una placa de cultivo de 96 pocillos, y se cultivaron selectivamente los hibridomas reemplazando el medio con medio de selección HAT los días 1, 2, 3 y 5 después de la fusión. Se midió la actividad de unión contra el Factor X por ELISA descrito en 2-2, usando el sobrenadante de cultivo extraído al octavo día de la fusión. Se seleccionaron los hibridomas que tenían actividad de unión al Factor X, y se midieron sus actividades para neutralizar la actividad enzimática del Factor Xa, de acuerdo con el método descrito en 2-3. Se clonaron los hibridomas que fueron incapaces de neutralizar la actividad enzimática del Factor Xa usando dos series de dilución limitante para establecer el hibridoma SB04 que producía anticuerpos anti-Factor X.

2-2. ELISA del Factor X

Se dispensó Factor X diluido a 1 µg/ml con tampón de recubrimiento en placa Nunc-Immuno a 100 µl/pocillo y, a continuación, se incubó durante la noche a 4 °C. Tras tres lavados con PBS (-) que contenía Tween® 20, la placa se bloqueó con tampón diluyente a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras la eliminación del tampón, se añadió sobrenadante de cultivo de hibridoma o anti-suero de ratón diluido con el tampón diluyente a la placa y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. La placa se lavó tres veces, después se añadió IgG anti-ratón de cabra marcada con fosfatasa alcalina (H + L) diluida a 1/2.000 con el tampón diluyente y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó seis veces, tras lo cual se añadió un sustrato colorimétrico Blue-Phos™ Phosphate Substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories) a 100 µl/pocillo. A continuación, la placa se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Tras añadir solución de parada Blue-Phos™ (Kirkegaard & Perry Laboratories) a 100 µl/pocillo, se midió la absorbancia a 595 nm con un lector de microplacas Modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories).

2-3. Medición de la actividad neutralizante del Factor Xa

Se mezclaron 10 µl de sobrenadante de cultivo de hibridoma diluido a 1/5 con TBSB con 40 µl de TBCP (TBSB que contiene CaCl₂ 2,78 mM, fosfolípidos 22,2 µM (fosfatidilcolina:fosfatidilserina = 75:25, Sigma-Aldrich)) que contenía 250 pg/ml de Factor Xa (Enzyme Research Laboratories) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. A esta solución mixta, se añadieron 50 µl de TBCP que contenía 20 µg/ml de protrombina (Enzyme Research Laboratories) y 100 ng/ml de factor de coagulación activado V (Factor Va (Haematologic Technologies)), y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se detuvo la reacción mediante la adición de 10 µl de EDTA 0,5 M. A esta solución de reacción, se añadieron 50 µl de solución S-2238 1 mM (Chromogenix), seguido de la incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos, momento en el que se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas Modelo 3550 (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Ejemplo 3. Construcción de vectores de expresión de anticuerpos biespecíficos quiméricos

3-1. Preparación de fragmentos de ADN codificantes de la región variable de anticuerpos a partir de hibridomas

5 Se extrajo ARN total de hibridoma XB12 que producía anticuerpo anti-F.IXa o hibridoma SB04 que producía anticuerpo anti-F.X usando el Mini Kit QIAGEN®RNeasy® (QIAGEN) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones. Se disolvió el ARN total en 40 µl de agua estéril. Se sintetizó ADNc monocatenario mediante RT-PCR usando el sistema de síntesis de ADNc Superscript (Invitrogen) con 1 a 2 µg del ARN purificado como molde de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones.

10

3-2. Amplificación por PCR de la región variable de cadena H del anticuerpo y análisis de la secuencia

Se prepararon la mezcla de cebador HB y la mezcla de cebador HF descritas en el informe de Krebber *et al.* (*J. Immunol. Methods* 1997; 201:35-55) como cebadores de la amplificación para el ADN de la región variable de cadena H de anticuerpo de ratón (VH). Usando 0,5 µl de mezcla de cebador HB 100 µM y 0,5 µl de mezcla de cebador HF 100 µM, se prepararon 25 µl de la solución de reacción (2,5 µl de solución de ADNc preparada en 3-1, tampón KOD plus (Toyobo), dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 0,75 unidades de ADN polimerasa KOD plus (Toyobo)). Se realizó la PCR usando un sistema de PCR 9700 GeneAmp con termociclador (Perkin Elmer) bien en la condición A (calentamiento a 98 °C durante 3 minutos, seguido de 32 ciclos de reacción a 98 °C durante 20 segundos, 58 °C durante 20 segundos y 72 °C durante 30 segundos por ciclo) o la condición B (calentamiento a 94 °C durante 3 minutos, seguido de 5 ciclos de la reacción a 94 °C durante 20 segundos, 46 °C durante 20 segundos y 68 °C durante 30 segundos por ciclo y 30 ciclos de reacción a los 94 °C durante 20 segundos, 58 °C durante 20 segundos, y 72 °C durante 30 segundos por ciclo), dependiendo de la eficacia de la amplificación del fragmento de ADNc. Tras la PCR, se sometió la solución de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se purificaron los fragmentos amplificados que tenían el tamaño de interés (aproximadamente 400 pb) usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones, y se eluyeron con 30 µl de agua estéril. Se determinó la secuencia de nucleótidos de cada fragmento de ADN mediante un secuenciador de ADN ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) usando un kit de secuenciación BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones. Se analizó el grupo de secuencias determinadas mediante este método comparativamente usando un programa informático de análisis GENETYX-SV/RC Versión 6.1 (Genetyx), y se seleccionaron las que tenían una secuencia diferente.

25

30

3-3. Preparaciones de fragmentos de ADN de la región variable de anticuerpo para la clonación

35 El siguiente procedimiento se realizó para añadir sitios de escisión de la enzima de restricción Sfi I para la clonación en ambos extremos de los fragmentos de la región variable de anticuerpo que fueron amplificados.

Para amplificar el sitio de escisión de Sfi I añadido a los fragmentos de VH (VH con Sfi I), se preparó un cebador (extremo 5' de VH del cebador) en el que se modificó la secuencia enlazadora de (Gly4Ser)₂ del cebador HB a una secuencia que tenía los sitios de escisión Sfi I. Usando 0,5 µl del extremo 5' de VH del cebador específico de la secuencia 10 µM y 0,5 µl del cebador scfor 10 µM (*J. Immunol. Methods* 1997; 201: 35-55), se preparó una solución de reacción (20 µl) (1 µl de solución purificada del fragmento de ADNc de VH amplificado preparado en 3-2, tampón KOD plus (TOYOBO), dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 0,5 unidades de ADN polimerasa KOD plus (Toyobo)). Usando un sistema de PCR 9700 GeneAmp con termociclador (Perkin Elmer), se realizó la PCR bien en la condición A (calentamiento a 98 °C durante 3 minutos, seguido de 32 ciclos de reacción a 98 °C durante 20 segundos, 58 °C durante 20 segundos y 72 °C durante 30 segundos por ciclo) o la condición B (calentamiento a 94 °C durante 3 minutos, seguido de 5 ciclos de la reacción a 94 °C durante 20 segundos, 46 °C durante 20 segundos y 68 °C durante 30 segundos por ciclo y 30 ciclos de reacción a los 94 °C durante 20 segundos, 58 °C durante 20 segundos, y 72 °C durante 30 segundos por ciclo), dependiendo de la eficacia de la amplificación de los fragmentos. Tras la PCR, se sometió la solución de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se purificaron los fragmentos amplificados que tenían el tamaño deseado (aproximadamente 400 pb) usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones, y se eluyeron con 30 µl de agua estéril.

40

45

50

Para amplificar fragmentos de ADNc de la región variable de cadena L (VL) de anticuerpo de ratón, primero se usaron 0,5 µl de cada una de la mezcla de cebador LB 100 µM y 0,5 µl de la mezcla de cebador LF 100 µM descritas en el informe de Krebber *et al.*, (*J. Immunol. Methods* 1997; 201:35-55), y se preparó una solución de reacción (25 µl) (2,5 µl de solución de ADNc preparada en 3-1, tampón KOD plus (TOYOBO), dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 0,75 unidades de ADN polimerasa KOD plus (Toyobo)). Usando un sistema de PCR GeneAmp 9700 con termociclador (Perkin Elmer), se realizó la PCR de acuerdo con la eficacia de amplificación de los fragmentos, en condiciones de calentamiento a 94 °C durante 3 minutos, seguido de 5 ciclos de reacción a 94 °C durante 20 segundos, 58 °C durante 20 segundos y 72 °C durante 30 segundos por ciclo. Tras la PCR, se sometió la solución de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se purificaron los fragmentos amplificados que tenían el tamaño deseado (aproximadamente 400 pb) usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones, y se eluyeron con 30 µl de agua estéril. Los fragmentos están en un estado en el que se añade la secuencia enlazadora de (Gly4Ser)₃ derivada del cebador LF a sus extremos C. Para agregar un sitio de escisión de Sfi I a los extremos C de los fragmentos, se preparó un cebador (extremo 3' de VL del cebador), en el

55

60

65

que la secuencia enlazadora de (Gly4Ser)₃ del cebador LF se modificó a una secuencia que tenía el sitio de escisión de Sfi I. Para amplificar los fragmentos VL añadidos al sitio de escisión de Sfi I (VL de Sfi I), se usaron 0,5 µl de mezcla de cebador del extremo 3' de VL 10 µM y 0,5 µl de cebador scback 10 µM, y se prepararon 20 µl de una solución de reacción (1 µl de una solución de fragmento de amplificación de ADNc de VL purificado, tampón KOD plus (TOYOBO), dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 0,5 unidades de ADN polimerasa KOD plus (Toyobo)). La PCR se realizó usando un sistema de PCR GeneAmp 9700 con termociclador (Perkin Elmer), en condiciones de calentamiento a 94 °C durante 3 minutos, seguido de 5 ciclos de reacción a 94 °C durante 20 segundos, 46 °C durante 20 segundos y 68 °C durante 30 segundos por ciclo y 30 ciclos de reacción a 94 °C durante 20 segundos, 58 °C durante 20 segundos y 72 °C durante 30 segundos por ciclo. Tras la PCR, se sometió la solución de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se purificaron los fragmentos amplificados que tenían el tamaño deseado (aproximadamente 400 pb) usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones, y se eluyeron con 30 µl de agua estéril.

Los fragmentos de VH con Sfi I y de VL con Sfi I purificados se digirieron con Sfi I (Takara Bio) a 50 °C durante la noche en una solución de reacción preparada de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones. Posteriormente, se purificó la solución de reacción usando un kit de purificación por PCR QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones, y se eluyó con 30 µl de tampón EB incluido en el kit.

3-4. Plásmido de expresión del anticuerpo IgG biespecífico quimérico de ratón anti-IgG4 humana

Se utilizó la técnica de botones en ojales de IgG1 (Documento no de patente 3) para producir el anticuerpo IgG biespecífico de interés, para permitir la formación de heteromoléculas en cada cadena H, y se preparó un sustituyente de aminoácidos en el que se sustituyó la parte de CH₃ de la IgG4. El tipo a (IgG4_{ya}) es una IgG4 sustituida en Y349C y T366W, y el tipo b (IgG4_{yb}) es una IgG4 sustituida en E356C, T366S, L368A y Y407V. Por otra parte, también se introdujo una sustitución (-ppcpScp → -ppcpPcp-) en las regiones de bisagra de ambas IgG4 sustituidas. Usando esta técnica, la mayor parte se convirtió en heteromoléculas. Sin embargo, esto no se aplica necesariamente a las cadenas L, y la generación de moléculas de anticuerpo innecesarias puede afectar a las mediciones de actividad subsiguientes. Por lo tanto, en este método, los que son inducibles por diferentes productos farmacéuticos se usaron como vectores de expresión para cada molécula HL para expresar por separado los brazos de cada molécula de anticuerpo (denominada molécula HL) que tienen diferentes especificidades, y para producir de manera eficaz el anticuerpo IgG biespecífico de interés dentro de las células.

Como vector de expresión de un brazo de la molécula de anticuerpo (denominada por comodidad molécula HL del brazo derecho), se preparó una región de cadena H o de cadena L respectiva incorporada a un vector pcDNA4 de tipo inducido por tetraciclina (Invitrogen) (pcDNA4-g4H o pcDNA4-g4L), es decir, una región variable (VH o VL) de anticuerpo de ratón adecuada y una región constante de IgG4_{ya} humana (SEQ ID NO: 9) o la región constante κ (SEQ ID NO: 10) incorporada aguas abajo de la secuencia señal (IL3ss) usada para células animales (*Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1984; 81:1075). En primer lugar, se usaron Eco RV y Not I (Takara Bio) para digerir pcDNA4 en los sitios de escisión de enzimas de restricción que están presentes en el sitio de clonación múltiple. Se digirió la unidad de expresión de cadena H o de cadena L del brazo derecho (aproximadamente 1,6 kb o aproximadamente 1,0 kb, respectivamente) de un anticuerpo biespecífico quimérico que tenía regiones variables de anticuerpos adecuados con Xho I (Takara Bio). A continuación, se purificó el anticuerpo con el kit de purificación por PCR QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones, y se hizo reaccionar con ADN polimerasa KOD (TOYOBO) a 72 °C durante 10 minutos en una composición de solución de reacción descrita en el manual de instrucciones para hacer romos los extremos. Los fragmentos con extremos romos se purificaron con el kit de purificación por PCR QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones, y se digirieron con Not I (Takara Bio). Los fragmentos con extremos romos con Not I (aproximadamente 1,6 kb o 1,0 kb, respectivamente) y el pcDNA4 digerido con Eco RV/Not I se sometieron a reacción de ligamiento usando Ligation High (TOYOBO), de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones. Se transformó una cepa DH5α de *E. coli* (Competent High DH5α (TOYOBO)) con la solución de reacción descrita anteriormente. A partir de los clones resistentes a la ampicilina así obtenidos, se aislaron los respectivos ADN de plásmido usando el Kit QIAprep Spin Miniprep de (QIAGEN).

De acuerdo con el método descrito anteriormente, para el otro brazo de la molécula de anticuerpo (denominada por comodidad molécula HL del brazo izquierdo), se preparó la respectiva región de cadena H o de cadena L incorporada al vector pIND de tipo inducible por el análogo de ecdisona (Invitrogen) (pIND-G4H o pIND-G4L), es decir, una región variable de anticuerpo de ratón adecuada (VH o VL) y una región constante de IgG4_{yb} humana (SEQ ID NO: 11) o la región constante κ incorporada aguas abajo de la secuencia señal (IL3ss) usada para células animales (*EMBO J.* 1987; 6: 2939). A continuación, se aislaron los ADN de los respectivos plásmidos.

3-5. Construcción de vectores de expresión de anticuerpos biespecíficos

Se digirió el plásmido de expresión de tipo inducido por tetraciclina preparado en 3-4 (pcDNA4-g4H o pcDNA4-g4L) con Sfi I, y se sometió la solución de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Los fragmentos (aproximadamente 5 kb) que carecían de la parte de región variable del anticuerpo original (VH o VL) se purificaron usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con el método descrito en el manual de

instrucciones, y se eluyeron con 30 µl de agua estéril. Los fragmentos, y el fragmento de VH con Sfi I o el fragmento de VL con Sfi I correspondiente derivado del anticuerpo XB12 anti-F.IXa digerido con Sfi preparado en 3-3, se sometieron a reacción de ligamiento usando el kit de ligamiento Quick (New England Biolabs) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones. Se transformó una cepa DH5α de *E. coli* (DH5α Competent High (TOYOBO)) con la solución de reacción descrita anteriormente. A continuación, los fragmentos obtenidos mediante la eliminación de la parte de la región variable del anticuerpo (VH o VL), usando una técnica similar a la descrita anteriormente a partir del plásmido de expresión de tipo inducida por el análogo de ecdisona digerido con Sfi I (pIND-g4H o pIND-g4L) preparado en 3-4, y el fragmento de VH con Sfi I o de VL con Sfi I derivado del anticuerpo SB04 anti-FX digerido con Sfi I correspondiente preparado en 3-3 se incorporaron mediante un método similar.

Se determinaron las secuencias de nucleótidos de cada fragmento de ADN usando un kit de secuenciación BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) y el secuenciador de ADN ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones. Se analizó un grupo de secuencias determinadas por el presente método usando un programa informático de análisis, GENETYX-SV/RC Versión 6.1 (Genetyx).

A partir de los clones de interés, se aislaron los respectivos ADN plasmídicos usando un Kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN), y después se disolvieron en 100 µl de agua estéril. El vector de expresión de cadena H quimérica de anticuerpo anti-F.IXa, el vector de expresión de cadena L quimérica de anticuerpo anti-F.IXa, el vector de expresión de cadena H quimérica de anticuerpo anti-F.X y el vector de expresión de cadena L quimérica de anticuerpo anti-F.X se denominaron pcDNA4-g4 XB12H, pcDNA4-g4 XB12L, pIND-g4 SB04H y pIND-g4 SB04L, respectivamente.

Ejemplo 4. Producción de anticuerpos biespecíficos quiméricos

4-1. Preparación de soluciones de ADN

La expresión de los vectores de expresión de la molécula HL de anticuerpo del brazo derecho (pcDNA4-g4 XB 12H y pcDNA4-g4 XB 12L) es inducida por la tetraciclina. En ausencia de tetraciclina, se requiere el plásmido pcDNA6/TR que codifica el represor Tet (Invitrogen) para suprimir completamente sus expresiones. Además, la expresión de los vectores de expresión de la molécula HL de anticuerpo del brazo izquierdo (pINE-g4 SB04H y pIND-g4 SB04L) fue inducida por un análogo de la hormona de insecto ecdisona (ponasterona A). Por lo tanto, para inducir la expresión, se requirió el plásmido pVgRXR (Invitrogen), que codifica el receptor de la ecdisona y el receptor del retinoide X que reaccionan con la ponasterona A. Por lo tanto, para la transfección de células animales, se preparó una mezcla de seis tipos de ADN de plásmido en total. Para 10 ml de cultivo celular, se usaron 3 µg de cada uno de pcDNA4-g4 XB12H, pcDNA4-g4 XB12L, pIND-g4 SB04H y pIND-g4 SB04L, así como 18 µg de cada uno de pcDNA6/TR y pVgRXR.

4-2. Transfección de células animales

Se suspendió la cepa HEK293H derivada de células de carcinoma renal fetal humano (Invitrogen) en un medio DMEM (Invitrogen) que contenía FCS al 10 % (MOREGATE), y se sembraron 10 ml de la misma a una densidad celular de 5×10^5 células/ml en cada placa usada para las células adhesivas (diámetro de 10 cm, CORNING) y se cultivaron durante un día y una noche en una incubadora de CO₂ (37 °C, CO₂ al 5 %). Se añadió la mezcla de ADN plasmídico preparada en 4-1 a una mezcla de reactivos de transfección, 75,8 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y 2708 µl de medio Opti-MEM I (Invitrogen), y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadió la mezcla resultante a las células en cada pocillo y se incubó durante 4 a 5 horas en un incubador de CO₂ (37 °C, CO₂ al 5 %).

4-3. Inducción de la expresión de anticuerpos IgG biespecíficos

Se retiró el medio de cultivo por aspiración del cultivo de células transfectadas como se ha descrito anteriormente, y después se añadieron 10 ml de un medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen) que contenía 1 µg/ml de tetraciclina (Wako Pure Chemical Industries). Se incubó esta mezcla durante un día en una incubadora de CO₂ (37 °C, CO₂ al 5 %) para inducir la expresión primaria de la molécula de anticuerpo HL del brazo derecho. Posteriormente, tras retirar el medio por aspiración y lavado con 10 ml de medio CHO-S-SFM-II, y añadir 10 ml de un medio CHO-S-SFM-II que contenía 5 µM de ponasterona A (Invitrogen), se incubó esto en una incubadora de CO₂ (37 °C, CO₂ al 5 %) durante 3 días, y se indujo la expresión secundaria de la molécula de anticuerpo HL del brazo izquierdo de manera que se secretó el anticuerpo IgG biespecífico en el medio. Se extrajo el sobrenadante de cultivo y se centrifugó (aproximadamente 2.000 g durante 5 min a temperatura ambiente) para eliminar las células, y después se esterilizó pasándolo a través de un filtro MILLEX®-GV de 0,22 µm (Millipore). La muestra se almacenó a 4 °C hasta su uso.

4-4. Purificación de anticuerpos

Se añadieron cien µl de Proteína A recombinante Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) a 10 ml del sobrenadante de cultivo obtenido de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 4-3, y se mezcló la solución por volteo a 4 °C durante 4 horas. Se transfirió la solución a una taza con filtro de 0,22 µm Ultrafree®-MC (Millipore) y,

tras lavar 3 veces, con 500 µl de TBS que contenía Tween® 20 al 0,01 %, se suspendió la resina de Proteína A recombinante Sepharose™ en 100 µl de HCl 10 mM que contenía Tween® 20 al 0,01 % a pH 2,0 y se dejó reposar durante 2 minutos. Después, se eluyó el anticuerpo, y el eluato se neutralizó inmediatamente mediante la adición de 5 µl de Tris-HCl 1 M, pH 8,0.

5

4-5. Cuantificación de la concentración de IgG humana

Se ajustó IgG de cabra anti-humana (Biosource International) a 1 µg/ml con un tampón de recubrimiento, y se inmovilizó en una placa Nunc-Immuno (Nunc). Tras bloquear con un tampón diluyente (D.B.), se añadió una muestra del sobrenadante de cultivo adecuadamente diluido con D.B. Además, como patrón para calcular la concentración de anticuerpo, se añadió igualmente IgG4 humana (anticuerpo anti-TF humanizado, véase el documento WO 99/51743) diluida con D.B. en una dilución en serie de factor de dilución de 3 hasta once etapas a partir de 2.000 ng/ml. Tras 3 lavados, se hizo reaccionar IgG de cabra anti-humana con fosfatasa alcalina (Biosource International). Tras 5 lavados, se desarrolló color usando sustrato de fosfatasa Sigma 104® (Sigma-Aldrich) como sustrato, y se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de la absorbancia modelo de 3550 (Bio-Rad Laboratories) con una longitud de onda de referencia de 655 nm. Usando el programa informático Microplate Manager III (Bio-Rad Laboratories), se calculó la concentración de IgG humana en el sobrenadante del cultivo a partir de la curva patrón.

10

15

Ejemplo 5. Ensayo de coagulación plasmática

20

Para determinar si un anticuerpo biespecífico corrige la capacidad de coagulación de la sangre hemofílica A, se examinaron los efectos del anticuerpo biespecífico sobre el tiempo de tromboplastina parcial activado (APTT) usando plasma deficitario en Factor VIII. Se calentó una solución mezclada que comprendía 50 µl de una solución de anticuerpo a varias concentraciones, 50 µl de plasma deficitario en Factor VIII (Biomerieux) y 50 µl de reactivo APTT (Dade Behring) a 37 °C durante 3 minutos. Se inició la reacción de coagulación añadiendo 50 µl de CaCl₂ 20 mM (Dade Behring) a esta solución mezclada. Se midió el tiempo requerido para la coagulación con KC10A (Amelung) conectado con CR-A (Amelung).

25

30

Usando una curva de calibrado producida definiendo el tiempo de coagulación para el plasma deficitario en Factor VIII como el 0 % y la coagulación para el plasma normal como el 100 %, se calculó la actividad de tipo Factor VIII (%) de un anticuerpo biespecífico a partir del tiempo de coagulación medido al añadir el anticuerpo biespecífico.

Ejemplo 6. Humanización del anticuerpo biespecífico

35

Se sometieron a humanización el anticuerpo XB12 anti-Factor IXa y el anticuerpo SB04 anti-Factor X, que eran los más eficaces en reducir el tiempo de coagulación sanguínea, de la siguiente manera.

6-1. Búsqueda por homología de anticuerpos humanos

40

Usando una base de datos construida usando los datos de secuencias de aminoácidos de anticuerpos humanos de la base de datos Kabat desvelada públicamente (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>) y la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr/>), se llevó a cabo la búsqueda por homología por separado para la región variable de la cadena H de XB12 de ratón, la región variable de la cadena L de XB12 de ratón, la región variable de la cadena H de SB04 de ratón y la región variable de la cadena L de SB04 de ratón. Los resultados confirmaron que tienen homologías altas para las secuencias de anticuerpos humanos mostradas a continuación, y por tanto, se decidió que se iban a usar como regiones marco conservadas (abreviadas como FR en lo sucesivo en el presente documento) de los anticuerpos humanizados.

45

50

(1) Región variable de la cadena H de XB12: KABATID-020619 (Base de datos Kabat) (Mariette *et al.*, *Arthritis Rheum.* 1993; 36: 1315-1324);

(2) Región variable de la cadena L de XB12: n.º de acceso de EMBL X61642 (Base de datos IMGT) (Mark *et al.*, *J. Mol. Biol.* 1991; 222: 581-597);

(3) Región variable de la cadena H de SB04: KABATID-025255 (Base de datos Kabat) (Demaison *et al.*, *Immunogenetics* 1995; 42: 342-352);

55

(4) Región variable de la cadena L de SB04: n.º de acceso de EMBL AB064111 (Base de datos IMGT) (datos no publicados).

60

Se prepararon anticuerpos humanizados en los que se injertaron regiones determinantes de la complementariedad (abreviadas en lo sucesivo en el presente documento como CDR) de cada anticuerpo de ratón en las FR de los anticuerpos humanos (1)-(4).

60

65

Además, se usó la búsqueda por homología en Internet divulgada públicamente por NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para buscar secuencias señal secretoras de anticuerpos humanos que fueran altamente homólogas a los anticuerpos humanos de (1)-(4). Se usaron las siguientes secuencias señal secretoras obtenidas con la búsqueda.

65

- (1) Región variable de la cadena H de XB12: n.º de acceso del GenBank AF062120;
- (2) Región variable de la cadena L de XB12: n.º de acceso del GenBank M74019;
- (3) Región variable de la cadena H de SB04: n.º de acceso del GenBank BCO19337;
- (4) Región variable de la cadena L de SB04: n.º de acceso del GenBank AY204756.

5

6-2. Construcción del vector de expresión génica del anticuerpo humanizado

Se prepararon doce oligoADN sintéticos de aproximadamente 50 bases a partir de una secuencia de nucleótidos codificante de la secuencia de aminoácidos de la secuencia señal secretora en la región variable del anticuerpo, de modo que aproximadamente 20 bases de su extremo 3' se hibridan entre sí. Además, se prepararon un cebador que se hibrida al extremo 5' de un gen de una región variable del anticuerpo y que tiene la secuencia de escisión de XhoI, y un cebador que se hibrida al extremo 3' de un gen de la región variable del anticuerpo y que tiene la secuencia de escisión de SfiI.

10

15

Se mezcló 1 µl de cada uno de los oligoADN sintéticos preparados a 2,5 µM, y se añadieron 1x tampón TaKaRa Ex Taq, dNTP 0,4 mM y 0,5 unidades de TaKaRa Ex Taq (todos de Takara Shuzo) para preparar 48 µl de una solución de reacción. Tras mantener esto a 94 °C durante 5 minutos, se realizaron 2 ciclos de reacción a 94 °C durante 2 minutos, 55 °C durante 2 minutos y 72 °C durante 2 minutos para montar y alargar cada uno de los oligoADN sintéticos. A continuación, se añadió 1 µl de cebador que se hibrida al extremo 5' y 1 µl de cebador que se hibrida al extremo 3' del gen del anticuerpo a 10 µM, y se amplificaron los genes de la región variable del anticuerpo mediante 35 ciclos de reacción a 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 min, y después con reacción a 72 °C durante 5 minutos. Tras la PCR, la cantidad total de la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se purificaron los fragmentos amplificados que tenían el tamaño de interés (aproximadamente 400 pb) usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones, y se eluyeron con 30 µl de agua estéril. Se clonaron estos fragmentos usando el sistema de vectores pGEM-T Easy (Promega) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones. Se determinó la secuencia de nucleótidos de cada uno de los fragmentos de ADN usando el kit de secuenciación BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) y el secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones.

20

25

30

A continuación, un plásmido que se había confirmado que tenía la secuencia génica de la región variable del anticuerpo humanizado correcta se digirió con EcoRI y SfiI, y la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se purificaron los fragmentos de ADN que tenían el tamaño de interés (aproximadamente 400 pb) usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones, y se eluyeron con 30 µl de agua estéril. Además, tras la digestión con EcoRI y SfiI de los plásmidos de expresión de tipo inducida por tetraciclina (pcDNA4-g4H, pcDNA4-g4L) y los plásmidos de expresión de tipo inducida por el análogo de ecdisona (pIND-g4H, pIND-g4L) preparados en el Ejemplo 3-3, los fragmentos que comprendían la región constante de anticuerpo (aproximadamente 5 kb) se purificaron usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones, y se eluyeron con 30 µl de agua estéril. El fragmento de gen de anticuerpo XB12 humanizado (región variable de cadena H o región variable de cadena L) digerido con EcoRI y SfiI, y el plásmido de expresión de tipo inducida por tetraciclina (pcDNA4-g4H, pcDNA4-g4L) digerido con EcoRI y SfiI se sometieron a reacción de ligamiento usando el kit de ligamiento de ADN Rapid (Roche Diagnostics) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones. Además, el fragmento de gen de anticuerpo SB04 humanizado digerido con EcoRI y SfiI (región variable de cadena H o región variable de cadena L), y el plásmido de expresión de tipo inducida por el análogo de ecdisona (pIND-g4H, pIND-g4L) digerido con EcoRI y SfiI se sometieron a reacción de ligamiento usando el kit de ligamiento de ADN Rapid (Roche Diagnostics) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones. Una parte de cada mezcla de reacción se usó para transformar la cepa DH5α de *E. coli* (TOYOBO).

40

45

50

Además, para la expresión como un anticuerpo humanizado habitual, pero no como un anticuerpo biespecífico, se preparó un vector de expresión de la siguiente manera. Los plásmidos (pCAG-g4H, pCAG-gk) con una inserción de regiones constantes de anticuerpos de tipo silvestre en pCAGGS que tiene un promotor de β-actina de pollo (Niwa *et al.*, 1991 *Gene*, 108:193-199) fueron digeridos con XhoI y SfiI para preparar plásmidos de expresión que portaran el fragmento de gen del anticuerpo XB12 humanizado (región variable de cadena H o región variable de cadena L) o un fragmento del gen del anticuerpo SB04 humanizado (región variable de cadena H o región variable de cadena L) recogidos tras la digestión, con XhoI y SfiI, del vector de expresión del anticuerpo biespecífico mencionado anteriormente. La reacción de ligamiento del ADN se realizó usando el kit de ligamiento del ADN Rapid (Roche Diagnostics), y la cepa DH5α de *E. coli* (TOYOBO) se transformó.

55

60

6-3. Preparación de anticuerpo biespecífico humanizado

Se transfectaron los genes y se indujo la expresión en HEK293H de acuerdo con los métodos descritos en los Ejemplos 4-2 y 4-3, usando 4 tipos de vectores de expresión de anticuerpos biespecíficos humanizados, así como pcDNA6/TR y pVgRXR. Además, de acuerdo con los métodos mostrados en los Ejemplos 4-4 y 4-5, se realizaron la purificación de los anticuerpos y la cuantificación de la concentración de los anticuerpos.

65

6-4. Preparación de los anticuerpos humanizados

Se realizó la expresión de un anticuerpo humanizado común, que no era un anticuerpo biespecífico, mediante la transfección de genes a HEK293H de acuerdo con el método mostrado en el Ejemplo 4-2, usando vector de expresión de anticuerpo de cadena H humanizado y vector de expresión de anticuerpo de cadena L humanizado preparado en el Ejemplo 6-3. Tras la transfección de los genes, se lavaron las células mediante la adición y la eliminación de 10 ml de medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen), a continuación, se añadieron 10 ml de CHO-S-SFM-II, y después se cultivaron las células durante 3 días en una incubadora con CO₂ (37 °C, CO₂ al 5 %) para la secreción de los anticuerpos humanizados.

6-5. Evaluación de la actividad del anticuerpo biespecífico humanizado y modificación de la secuencia del anticuerpo

Para evaluar la capacidad de coagulación plasmática del anticuerpo biespecífico humanizado preparado y del anticuerpo biespecífico quimérico XB12/SB04, se examinaron los efectos de los anticuerpos sobre APTT usando plasma deficiente en F.VIII de acuerdo con el método del Ejemplo 5. Los aminoácidos de la FR del anticuerpo humano se modificaron para aumentar las actividades de los anticuerpos biespecíficos humanizados cuya capacidad de coagulación sanguínea se ha reducido. Además, los restos de cisteína de la CDR3 de VH del anticuerpo XB12, cuya caída posible en la termoestabilidad es un problema, se modificaron a alanina. Concretamente, se introdujeron mutaciones en la región variable del anticuerpo humanizado usando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange (Stratagene) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones. Mediante la repetición de las modificaciones de aminoácidos de la secuencia de FR y la evaluación de la capacidad de coagulación sanguínea, se obtuvo un anticuerpo biespecífico humanizado (anticuerpo XB12 humanizado (VH: hXB12f-A, VL: hXBVL)/anticuerpo SB04 humanizado (VH: hSB04e, VL: hSBVL-F3f)) que tenía la misma actividad que XB12/SB04. Cada secuencia de la región variable de anticuerpo se muestra en las siguientes SEQ ID NO.

- (1) VH del anticuerpo XB12 humanizado (hXB12f-A) SEQ ID NO: 1 (secuencia de nucleótidos), SEC ID NO: 2 (secuencia de aminoácidos);
- (2) VL del anticuerpo XB12 humanizado (hXBVL) SEQ ID NO: 3 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 4 (secuencia de aminoácidos);
- (3) VH del anticuerpo humanizado SB04 (hSB04e) SEQ ID NO: 5 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 6 (secuencia de aminoácidos);
- (4) VL del anticuerpo humanizado SB04 (hSBVL-F3f) SEQ ID NO: 7 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 8 (secuencia de aminoácidos).

Ejemplo 7. Modelización del anticuerpo humanizado

Se preparó un modelo de región Fv del anticuerpo mediante modelización de homología usando el programa informático MOE (Chemical Computing Group Inc.) para confirmar los restos de aminoácido de la superficie de contacto VH-VL del anticuerpo humanizado SB04. Los aminoácidos de H39 y L38 de la superficie de contacto VH-VL son ambos glutamina (Gln) y se confirmó la formación de los enlaces de hidrógeno por las cadenas laterales de ambos restos (Fig. 1A). Los aminoácidos de H45 y L44 eran leucina (Leu) y prolina (Pro), respectivamente, las cadenas laterales de ambos restos estaban muy cerca entre sí y resultaron formar un núcleo hidrófobo (Fig. 1B). Se ha informado que los restos de aminoácidos de estas dos posiciones se conservan a nivel alto en los anticuerpos humanos (Vargas-Madrado E. *et al. J. Mol. Recognit.* 2003,16: 113-120). La numeración de estos anticuerpos tales como H39, L38, H45 y L44 se basa en la bibliografía de Kabat *et al.* (Kabat EA *et al.* 1991. Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico. NIH).

Ejemplo 8. Preparación y evaluación de anticuerpo humanizado modificado con los aminoácidos H39 y L38

8-1. Construcción de un vector de expresión de anticuerpo modificado con H39 y L38

Para inhibir la asociación entre la cadena H de XB12 humanizado y la cadena L de SB04 humanizado, se sustituyeron la glutamina H39 de la cadena H de XB12 humanizado y la glutamina L38 de la cadena L de SB04 humanizado basándose en los hallazgos del Ejemplo 7. Concretamente, para inhibir el enlace de hidrógeno de las cadenas laterales de glutamina y para permitir la repulsión electrostática, ambos aminoácidos (H39 y L38) se sustituyeron con lisina (Lys) o arginina (Arg) portadoras de una carga positiva en su cadena lateral, o con ácido glutámico (Glu) o ácido aspártico (Asp) portadores de una carga negativa en su cadena lateral. La sustitución del gen del anticuerpo humanizado se realizó usando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange (Stratagene), y las mutaciones se introdujeron de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones. Se insertó cada fragmento de gen de anticuerpo humanizado portador de las sustituciones de aminoácido en un vector de expresión de anticuerpos biespecíficos usado en el Ejemplo 6-2 o en un vector de expresión de anticuerpos comunes.

8-2. Preparación de anticuerpos para la evaluación de la regulación de la asociación y evaluación de la regulación de la asociación de los anticuerpos

Para evaluar la regulación de la asociación de la cadena H y de la cadena L, se realizó la transfección génica en HEK293H de acuerdo con el método mostrado en el Ejemplo 4-2 usando 3 tipos de vectores de expresión de anticuerpos preparados: cadena H de XB12 humanizado (modificada en H39), cadena L de SB04 humanizado (modificada en L38) y cadena L de XB12 humanizado de tipo silvestre. A continuación, se secretaron los anticuerpos en el sobrenadante del cultivo. Seguidamente, se llevaron a cabo la purificación de los anticuerpos y la cuantificación de la concentración de anticuerpos de acuerdo con los métodos de los Ejemplos 4-4 y 4-5.

Se redujeron doscientos ng de anticuerpos purificados en un tampón de muestra (TEFCO), se aplicaron a un mini gel de SDS-PAGE al 14 % (TEFCO) y después se sometieron a electroforesis. Tras la electroforesis, se sometieron los geles a un tratamiento de inmovilización mediante inmersión en solución de ácido acético al 7 % que contenía metanol al 10 % durante 30 minutos, y después se tiñeron por inmersión en solución de tinción de gel de proteínas SYPRO® Ruby (BIO-RAD) durante un día y una noche. Posteriormente, se sometieron los geles a tratamiento de decoloración por inmersión en solución de ácido acético al 7 % que contenía metanol al 10 % durante 1 hora, y se analizó la imagen usando un generador de imágenes de fluorescencia FluorImager SI (Amersham Biosciences) y se obtuvo la imagen. La imagen obtenida se usó para calcular las intensidades de fluorescencia de las bandas de la cadena H y de la cadena L usando ImageQuant ver. 40.2 (Amersham Biosciences).

Los resultados se muestran en la Fig. 2. Se calculó la proporción (%) de la cadena L de XB12 de interés de acuerdo con la fórmula "cadena L de XB12/cantidad total de cadena L (cadena L de XB12 + cadena L de SB04) x 100" usando los valores de intensidad de la fluorescencia calculados. La proporción fue del 50 % cuando los aminoácidos de la cadena H de XB12 humanizado (H39) y de la cadena L de SB04 humanizado (L38) eran glutamina (Gln) como en el tipo silvestre, mientras que la proporción de la cadena L de XB12 humanizado aumentó cuando se sustituyeron H39 y L38. En el caso de la sustitución de ácido glutámico (Glu), esta proporción resultó aumentar 1,6 veces hasta el 82 %.

8-3. Preparación de anticuerpos biespecíficos para la evaluación de la actividad de coagulación y evaluación de la actividad de coagulación de los anticuerpos

Para evaluar la actividad de coagulación, se llevaron a cabo la transfección génica en HEK293H y la inducción de la expresión de acuerdo con los métodos descritos en los Ejemplos 4-2 y 4-3, usando el vector de expresión de anticuerpo biespecífico de la cadena H de XB12 humanizado (modificada en H39) y la cadena L de SB04 humanizado (modificada en L38) preparado y el vector de expresión de anticuerpo biespecífico de la cadena L de XB12 humanizado y de la cadena H de SB04 humanizado de tipo silvestre, pcDNA6/TR y pVgRXR. Además, se llevaron a cabo la purificación de los anticuerpos y la cuantificación de la concentración de los anticuerpos de acuerdo con los métodos de los Ejemplos 4-4 y 4-5.

La evaluación de la actividad de coagulación se realizó de acuerdo con el método mostrado en el Ejemplo 5, y los resultados se muestran en la Fig. 3. El anticuerpo modificado con ácido glutámico (Glu: E) cuya proporción aumentó hasta el 82 % en la evaluación de la regulación de la asociación resultó mostrar una actividad de coagulación superior o igual a la del tipo silvestre.

8-4. Preparación de anticuerpos para la evaluación de la actividad de unión

Para evaluar la actividad de unión al Factor IXa y al Factor X, se realizaron la transfección génica en HEK293H y la secreción de los anticuerpos en el sobrenadante del cultivo de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 4-2, usando el vector de expresión de anticuerpos de la cadena H de XB12 humanizado (modificada en H39) y la cadena L de XB12 humanizado de tipo silvestre y el vector de expresión de anticuerpos de la cadena H de SB04 humanizado y la cadena L de SB04 humanizado de tipo silvestre (modificado en L38). Además, se llevaron a cabo la purificación de los anticuerpos y la cuantificación de la concentración de los anticuerpos de acuerdo con los métodos de los Ejemplos 4-4 y 4-5.

La evaluación de la actividad de unión contra el Factor IXa y el Factor X se realizó de acuerdo con los métodos descritos en los Ejemplos 1-2 y 2-2. Los resultados se muestran en la Fig. 4 y la Fig. 5. Se confirmó que la sustitución de los aminoácidos en H39 y L38 no alteró la actividad de unión.

Estos resultados sugerían que, mediante la modificación en H39 de la cadena H de XB12 y en L38 de la cadena L de SB04, la proporción de anticuerpos biespecíficos de interés podría aumentarse sin reducir las actividades biológicas, incluyendo la actividad de unión a los antígenos y la actividad de coagulación que sustituye el Factor VIII. Hasta el momento, incluyendo los métodos que usan la técnica del botón y el ojal, no se ha informado de casos en los que se haya regulado la asociación mediante la introducción de la mutación de un solo aminoácido en un polipéptido sin reducir la función. Por consiguiente, los hallazgos de la presente invención se consideran los primeros de este tipo.

Ejemplo 9. Preparación y evaluación de anticuerpo humanizado modificado en el aminoácido L44

9-1. Construcción de un vector de expresión de anticuerpo modificado en L44

5 Para inhibir la asociación entre la cadena H de XB12 humanizado y la cadena L de SB04 humanizado, basándose en los resultados en el Ejemplo 7, se sustituyó la prolina L44 de la cadena L de SB04 humanizado con un aminoácido portador de una carga en su cadena lateral. Concretamente, se sustituyó la prolina presente en el núcleo hidrófobo de la superficie de contacto VH-VL con la lisina (Lys) o arginina (Arg) portadora de carga positiva en su cadena lateral, y el ácido glutámico (Glu) portador de carga negativa en su cadena lateral se sustituyó con ácido aspártico (Asp). La sustitución del gen del anticuerpo humanizado se realizó usando el kit de mutagénesis dirigida QuickChange (Stratagene), y las mutaciones se introdujeron de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones. Cada fragmento de gen de anticuerpo humanizado que tiene sustituciones de aminoácidos se insertó en un vector de expresión del anticuerpo biespecífico usado en el Ejemplo 6-2 o en un vector de expresión de anticuerpo común.

9-2. Preparación de anticuerpos para la evaluación de la regulación de la asociación y evaluación de la regulación de la asociación de los anticuerpos

20 Para evaluar la regulación de la asociación de la cadena H y de la cadena L, se realizó la transfección génica en HEK293H de acuerdo con el método del Ejemplo 4-2 usando 3 tipos de vectores de expresión de anticuerpos preparados: cadena L de SB04 humanizado (modificada en L44), cadena H de XB12 humanizado de tipo silvestre y cadena L de XB12 humanizado de tipo silvestre, y se secretaron los anticuerpos en el sobrenadante de cultivo. Seguidamente, se llevaron a cabo la purificación de los anticuerpos y la cuantificación de la concentración de anticuerpos de acuerdo con los métodos de los Ejemplos 4-4 y 4-5.

25 Se redujeron doscientos ng de anticuerpos purificados en un tampón de muestra (TEFCO), se aplicaron a un mini gel de SDS-PAGE al 14 % (TEFCO) y después se sometieron a electroforesis. Tras la electroforesis, se sometieron los geles a un tratamiento de inmovilización mediante inmersión en solución de ácido acético al 7 % que contenía metanol al 10 % durante 30 minutos, y después se tiñeron por inmersión en solución de tinción de gel de proteínas SYPRO® Ruby (BIO-RAD) durante un día y una noche. Posteriormente, se sometieron los geles a un tratamiento de decoloración por inmersión en solución de ácido acético al 7 % que contenía metanol al 10 % durante 1 hora, y se analizó la imagen usando un generador de imágenes de fluorescencia FluorImager SI (Amersham Biosciences) y se obtuvieron las imágenes. Las imágenes obtenidas se usaron para calcular las intensidades de fluorescencia de las bandas de la cadena H y de la cadena L usando ImageQuant ver. 40.2 (Amersham Biosciences).

30 Los resultados se muestran en la Fig. 6. Se calculó la proporción (%) de la cadena L de XB12 de interés de acuerdo con la fórmula "cadena L de XB12/cantidad total de cadena L (cadena L de XB12 + cadena L de SB04) x 100" usando los valores de intensidad de la fluorescencia calculados. La proporción fue del 47 % cuando el aminoácido de la cadena L de SB04 humanizado (L44) fue prolina (Pro) como en el tipo silvestre, mientras que la proporción de la cadena L de XB12 humanizado aumentó cuando se sustituyó L44, y esta proporción resultó aumentar de 1,8 a 1,9 veces hasta el 86-90 %.

9-3. Preparación de anticuerpos biespecíficos para la evaluación de la actividad de coagulación y evaluación de la actividad de coagulación de los anticuerpos

45 Para evaluar la actividad de coagulación, se llevaron a cabo la transfección génica en HEK293H y la inducción de la expresión de acuerdo con los métodos descritos en los Ejemplos 4-2 y 4-3, usando el vector de expresión de anticuerpo biespecífico de la cadena L de SB04 humanizado (modificada en L44) preparado y el vector de expresión de anticuerpo biespecífico de la cadena H de XB12 humanizado, de la cadena L de XB12 humanizado y de la cadena H de SB04 humanizado de tipo silvestre, pcDNA6/TR y pVgRXR. Además, se llevaron a cabo la purificación de los anticuerpos y la cuantificación de la concentración de los anticuerpos de acuerdo con los métodos de los Ejemplos 4-4 y 4-5.

50 La evaluación de la actividad de coagulación se realizó de acuerdo con el método mostrado en el Ejemplo 5, y los resultados se muestran en la Fig. 7. Todos los anticuerpos modificados cuya proporción había aumentado en la evaluación de la regulación de la asociación resultaron mostrar una actividad de coagulación superior a la del tipo silvestre.

9-4. Preparación de anticuerpos para la evaluación de la actividad de unión

60 Para evaluar la actividad de unión al Factor X, se realizaron la transfección génica en HEK293H y la secreción de los anticuerpos en el sobrenadante del cultivo de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 4-2, usando el vector de expresión de anticuerpos de la cadena H de SB04 humanizado y la cadena L de SB04 humanizado (modificado en L44) de tipo silvestre. Además, se llevó a cabo la cuantificación de la concentración de los anticuerpos en el sobrenadante de cultivo de acuerdo con el método del Ejemplo 4-5.

La evaluación de la actividad de unión contra el Factor X se realizó usando el sobrenadante de cultivo de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 2-2. Los resultados se muestran en la Fig. 8. Se confirmó que la sustitución del aminoácido en L44 no altera la actividad de unión.

- 5 Estos resultados sugerían que, mediante la modificación del aminoácido en una posición, L44, de la cadena L de SB04, la proporción de anticuerpos biespecíficos de interés podría aumentarse sin reducir las actividades biológicas, incluyendo la actividad de unión a los antígenos y la actividad de coagulación que sustituye el Factor VIII. Hasta el momento, incluyendo los métodos que usan la técnica del botón y el ojal, no se ha informado de casos en los que se haya regulado la asociación mediante la introducción de un solo aminoácido en un polipéptido sin reducir la función.
- 10 Por consiguiente, los hallazgos de la presente invención se consideran los primeros de este tipo.

Ejemplo 10. Preparación y evaluación de anticuerpo humanizado modificado en los aminoácidos H39, L38 y L44

10-1. Construcción de un vector de expresión de anticuerpo modificado en los aminoácidos H39, L38 y L44

- 15 Para inhibir la asociación entre la cadena H de XB12 humanizado y la cadena L de SB04 humanizado, se sustituyeron H39 de la cadena H de XB12 humanizado, y L38 y L44 de la cadena L de SB04 humanizado con aminoácidos portadores de una carga en su cadena lateral basándose en los hallazgos de los Ejemplos 8 y 9. Concretamente, se sustituyeron ambos aminoácidos de H39 de la cadena H de XB12 humanizado y L38 de la
- 20 cadena L de SB04 humanizado con ácido glutámico (Glu), que resultó ser más eficaz en el Ejemplo 8, y la prolina presente en L44 de la cadena L de SB04 humanizado se sustituyó con lisina (Lys) o arginina (Arg) portadora de una carga positiva en su cadena lateral, o con ácido glutámico (Glu) o ácido aspártico (Asp) portadores de una carga negativa en su cadena lateral. La sustitución del gen del anticuerpo humanizado se realizó usando el kit de mutagénesis dirigida QuickChange (Stratagene), y las mutaciones se introdujeron de acuerdo con el método descrito
- 25 en el manual de instrucciones. Cada fragmento de gen de anticuerpo humanizado portador de las sustituciones de aminoácidos se insertó en el vector de expresión del anticuerpo biespecífico usado en el Ejemplo 6-2 o un vector de expresión de anticuerpo común.

- ##### 30 10-2. Preparación de anticuerpos para la evaluación de la regulación de la asociación y evaluación de la regulación de la asociación de los anticuerpos

- Para evaluar la regulación de la asociación de la cadena H y de la cadena L, se realizó la transfección génica en HEK293H de acuerdo con el método del Ejemplo 4-2 usando 3 tipos de vectores de expresión de anticuerpos preparados: cadena L de SB04 humanizado modificada, cadena H de XB12 humanizado modificada y cadena L de
- 35 XB12 humanizado de tipo silvestre. A continuación, se secretaron los anticuerpos en el sobrenadante de cultivo. Seguidamente, se llevaron a cabo la purificación de los anticuerpos y la cuantificación de la concentración de anticuerpos de acuerdo con los métodos de los Ejemplos 4-4 y 4-5.

- Se redujeron doscientos ng de anticuerpos purificados en un tampón de muestra (TEFCO), se aplicaron a un mini gel de SDS-PAGE al 14 % (TEFCO) y después se sometieron a electroforesis. Tras la electroforesis, se sometieron los geles a un tratamiento de inmovilización mediante inmersión en solución de ácido acético al 7 % que contenía metanol al 10 % durante 30 minutos, y después se tiñeron por inmersión en solución de tinción de gel de proteínas SYPRO® Ruby (BIO-RAD) durante un día y una noche. Posteriormente, se sometieron los geles a tratamiento de decoloración por inmersión en solución de ácido acético al 7 % que contenía metanol al 10 % durante 1 hora, y se
- 45 analizó la imagen usando un generador de imágenes de fluorescencia FluorImager SI (Amersham Biosciences) y se obtuvieron las imágenes. Las imágenes obtenidas se usaron para calcular las intensidades de fluorescencia de las bandas de la cadena H y de la cadena L usando ImageQuant ver. 40.2 (Amersham Biosciences).

- Los resultados se muestran en la Fig. 9. Se calculó la proporción (%) de la cadena L de XB12 de interés de acuerdo con la fórmula "cadena L de XB12/cantidad total de cadena L (cadena L de XB12 + cadena L de SB04) x 100" usando los valores de intensidad de la fluorescencia calculados. La proporción fue del 82 % cuando los dos aminoácidos de la cadena H de XB12 humanizado (H39) y la cadena L de SB04 humanizado (L38) se modificaron con el ácido glutámico (Glu), y la cadena L de SB04 humanizado (L44) era prolina (Pro) como en el tipo silvestre, mientras que la proporción de la cadena L de XB12 humanizado aumentó hasta el 94-96 % cuando se sustituyó L44 además de la sustitución de los dos aminoácidos de la cadena H de XB12 humanizado (H39) y la cadena L de SB04 humanizado (L38) con ácido glutámico (Glu). Este aumento de la proporción fue superior al 86-90 % observado cuando solo se sustituyó L44 en el Ejemplo 9.
- 50
- 55

- ##### 60 10-3. Preparación de anticuerpos biespecíficos para la evaluación de la actividad de coagulación y evaluación de la actividad de coagulación de los anticuerpos

- Para evaluar la actividad de coagulación, se llevaron a cabo la transfección génica en HEK293H y la inducción de la expresión de acuerdo con los métodos descritos en los Ejemplos 4-2 y 4-3, usando el vector de expresión de anticuerpo biespecífico de la cadena H de XB12 humanizado modificada, la cadena L de XB12 humanizado y la
- 65 cadena H de SB04 humanizado preparado y el vector de expresión de anticuerpo biespecífico de la cadena H de XB12 humanizado, de la cadena L de XB12 humanizado y de la cadena H de SB04 humanizado de tipo silvestre,

pcDNA6/TR y pVgRXR. Además, se llevaron a cabo la purificación de los anticuerpos y la cuantificación de la concentración de los anticuerpos de acuerdo con los métodos de los Ejemplos 4-4 y 4-5.

La evaluación de la actividad de coagulación se realizó de acuerdo con el método mostrado en el Ejemplo 5, y los resultados se muestran en la Fig. 10. Todos los anticuerpos modificados cuya proporción había aumentado en la evaluación de la regulación de la asociación resultaron mostrar una actividad de coagulación superior a la del tipo silvestre.

10-4. Preparación de anticuerpos para la evaluación de la actividad de unión

Para evaluar la actividad de unión al Factor X, se realizaron la transfección génica en HEK293H y la secreción de los anticuerpos en el sobrenadante del cultivo de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 4-2, usando el vector de expresión de anticuerpos de la cadena H de SB04 humanizado y la cadena L de SB04 humanizado modificada de tipo silvestre. Además, se llevó a cabo la cuantificación de la concentración de los anticuerpos en el sobrenadante de cultivo de acuerdo con el método del Ejemplo 4-5.

La evaluación de la actividad de unión contra el Factor X se realizó usando el sobrenadante de cultivo de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 2-2. Los resultados se muestran en la Fig. 11. Se confirmó que la sustitución de ambos aminoácidos en L38 y L44 no alteró la actividad de unión.

Estos resultados sugerían que, mediante la modificación de los aminoácidos en H39 de la cadena H de XB12, y L38 y L44 en la cadena L de SB04, la proporción de anticuerpos biespecíficos de interés se puede aumentar sin reducir las actividades biológicas que son la actividad de unión a los antígenos y la actividad de coagulación que sustituyen el Factor VIII. Se encontró que la proporción del anticuerpo biespecífico aumentó a medida que aumentaba el número de aminoácidos modificados en la superficie de contacto.

Ejemplo 11. Separación y determinación de la estructura de los isómeros estructurales de sc(Fv)₂ u2-wz4 hVB22B

11-1. Preparación del anticuerpo anti-Mpl humano humanizado sc(Fv)₂ u2-wz4 hVB22B

Los métodos de producción de sc(Fv)₂ u2-wz4 hVB22B (denominado en lo sucesivo en el presente documento u2-wz4) que es un anticuerpo anti-Mpl humanizado se describen en el documento WO2005/56604. Este gen se preparó mediante PCR usando una secuencia de nucleótidos codificante de la secuencia enlazadora (GlyGlyGlyGlySer) x 3 de modo que comprendiera una secuencia de nucleótidos compuesta de VH - secuencia enlazadora - VL - secuencia enlazadora - VH - secuencia enlazadora - VL (véase SEQ ID NO: 12; y SEQ ID NO: 286 del documento WO2005/56604). Una vez confirmada la secuencia de nucleótidos del gen, se prepararon las líneas celulares con expresión estable mediante la construcción de un vector de expresión por clonación de un fragmento de ADN en el vector de expresión pCXND3, y la introducción del gen en las células CHO-DG44. Más concretamente, se dispusieron 0,75 ml de una mezcla del vector de expresión (20 µg) y células CHO-DG44 (1 x 10⁷ células/ml) suspendidas en PBS en hielo durante 10 minutos y se transfirieron a una cubeta, y después se aplicó un pulso a 1,5 kV y 25 µFD usando un Gene Pulser Xcell (BioRad). Tras un período de recuperación de 10 minutos a temperatura ambiente, se seleccionaron las células sometidas al tratamiento de electroporación mediante su inclusión en un medio CHO-S-SFMII (Invitrogen) que contenía 500 µg/ml de geneticina (Invitrogen) y se estableció una línea celular CHO productora de u2-wz4.

Dado que el anticuerpo humanizado, sc(Fv)₂ u2-wz4 hVB22B, no tiene un marcador Flag añadido, se llevó a cabo la purificación del sobrenadante del cultivo usando una proteína de fusión de GST y MG10 (Gln213 a Ala231 en la secuencia de aminoácidos de Mpl humano), que es un epítipo reconocido por el anticuerpo. La proteína de fusión MG10-GST se purificó usando Glutación Sefarosa 4B (Amersham Biosciences) de acuerdo con el protocolo del proveedor. A continuación, se inmovilizó la proteína de fusión MG10-GST purificada sobre HP activada con NHS HiTrap (Amersham Biosciences) para preparar una columna de afinidad de acuerdo con el protocolo del proveedor. Se cargó el sobrenadante del cultivo de las células CHO que expresaban el anticuerpo humanizado, sc(Fv)₂ u2-wz4 hVB22B, en la columna de proteína de fusión MG10-GST inmovilizada, se adsorbió el anticuerpo sc(Fv)₂ u2-wz4 hVB22B humanizado a la columna y, a continuación, se eluyó con glicina-HCl 100 mM (pH 3,5), Tween80 al 0,01 %. Las fracciones eluidas se neutralizaron inmediatamente con Tris-HCl 1 M (pH 7,4), y el monómero se purificó por cromatografía de filtración en gel usando HiLoad 16/60 Superdex200pg (Amersham Biosciences). Se usó tampón citrato 20 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 300 mM y Tween 80 al 0,01 % en la cromatografía de filtración en gel.

11-2. Separación y purificación de isómeros conformacionales de sc(Fv)₂ u2-wz4 hVB22B

Dado que sc(Fv)₂ u2-wz4 hVB22B es un sc(Fv)₂ compuesto de la secuencia VH₁-enlazador-VL₂-enlazador-VH₃-enlazador-VL₄, como se muestra en la Fig. 12, dependiendo de la combinación de Fv (moléculas que tienen enlaces no covalentes entre VH y VL), pueden existir 2 tipos de isómeros conformacionales, como en sc(Fv)₂ VB22B, que sean de tipo scFv bivalente en el que cada uno de los pares de VH₁ y VL₂, y VH₃ y VL₄ forme un Fv, y de tipo diacuerpo monocatenario en el que cada uno de los pares de VH₁ y VL₄, y VH₂ y VL₃ forme un Fv.

El resultado del examen de la separación de los isómeros conformacionales de sc(Fv)₂ u2-wz4 hVB22B sugirió que cada componente de sc(Fv)₂ u2-wz4 hVB22B se puede separar mediante cromatografía de intercambio catiónico usando Bio Assist S (TOSOH) en las siguientes condiciones de elución.

- 5 Fase móvil A: fosfato de sodio 20 mM, pH 7,5.
Fase móvil B: fosfato de sodio 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5.
Caudal: 0,8 ml/min.
Gradiente: B al 0 % a B al 35 % (30 minutos).
- 10 En las condiciones anteriormente mencionadas, se separó sc(Fv)₂ u2-wz4 hVB22B en dos picos. Se obtuvo el cromatograma mostrado en la Fig. 13, y partiendo del tiempo de retención más corto, los picos se nombraron pico 1 y pico 2.
- 15 Se midieron el peso molecular del pico 1 y del pico 2 usando un espectrómetro de masas de tipo Q-TOF (Q T de Ultima, Micro Mass). Se infundieron las soluciones de muestra en Q-TOF, y la deconvolución de los espectros de iones polivalentes obtenidos (+) usando el programa informático incluido (MassLynx) dieron resultados que muestran que el peso molecular del pico 1 y del pico 2 es de 53.768 Da y 53.769 Da, respectivamente. Esto mostró que el pico 1 y el pico 2 tienen el mismo peso molecular.
- 20 Se realizó la cartografía de péptidos en el pico 1 y en el pico 2. Tras la desnaturalización reductora y la carboximetilación, se obtuvieron fragmentos de péptidos por digestión usando tripsina, y se obtuvieron mapas de péptidos mediante cromatografía de fase inversa (YMC-Pack-ODS). Comparando los mapas peptídicos del pico 1 y del pico 2, los patrones de cartografía del pico 1 y del pico 2 fueron los mismos que se muestran en la Fig. 14, por lo tanto, la estructura primaria de aminoácidos resultó ser la misma.
- 25 Dado que sc(Fv)₂ u2-wz4 hVB22B no está glicosilado, el pico 1 y el pico 2 tienen el mismo peso molecular de acuerdo a las mediciones de TOF-MASS, y el pico 1 y el pico 2 tienen los mismos patrones de cartografía, el pico 1 y el pico 2 resultaron ser isómeros conformacionales que tenían diferentes estructuras tridimensionales.
- 30 Dado que sc(Fv)₂ u2-wz4 hVB22B es un sc(Fv)₂ que comprende la secuencia, VH₁-enlazador-VL₂-enlazador-VH₃-enlazador-VL₄, como se muestra en la Fig. 12, dependiendo de la combinación de Fv (moléculas que comprenden enlaces no covalentes entre VH y VL), pueden existir 2 tipos de isómeros conformacionales. En concreto, los isómeros son el tipo scFv bivalente, en el que cada uno de los pares de VH₁ y VL₂, y VH₃ y VL₄ forma un Fv, y de tipo diacuerpo monocatenario, en el que cada uno de los pares de VH₁ y VL₄, y VH₂ y VL₃ forma un Fv. Se considera
- 35 que el pico 1 y el pico 2 tienen una cualquiera de las conformaciones; el tipo scFv bivalente o el tipo diacuerpo monocatenario.
- La proteólisis limitada a la proteasa se desarrolló como un método de análisis para la identificación de los dos tipos de isómeros conformacionales. Dado que la parte de enlazador de sc(Fv)₂ tiene una estructura relativamente libre,
- 40 se considera que tiene una baja resistencia a las proteasas, y el pico 1, pico 2 y sc(Fv)₂ u2-wz4 hVB22B (la proporción del pico 1:pico 2 es de aproximadamente 1:4) se hicieron reaccionar con la subtilisina A, un tipo de proteasa, en las siguientes condiciones:
- 45 citrato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5
pico 1 o pico 2 de sc(Fv)₂ u2-wz4 hVB22B: 0,15 mg/ml
Subtilisina A: 10 µg/ml
37 °C, 30 minutos.
- 50 Tras la reacción, se realizó SDS-PAGE reductora usando PhastGel homogéneo al 12,5 %. Como resultado de ello, como se muestra en la Fig. 15, sc(Fv)₂ u2-wz4 hVB22B a granel, el pico 1 y el pico 2, todos mostraron los mismos patrones de bandas. Se encontró que el uso de las condiciones de reacción mencionadas anteriormente permiten la digestión parcial y limitada de las partes de enlazador de sc(Fv)₂ u2-wz4 hVB22B, ya que se obtuvieron bandas específicas para cada uno de los fragmentos que parecían estar producidas por la digestión de la tres partes de enlazador de sc(Fv)₂ u2-wz4 hVB22B.
- 55 Cuando se escinde uno de los tres enlazadores en las conformaciones de tipo scFv bivalente y de tipo diacuerpo monovalente, como se muestra en la Fig. 16, en condiciones naturales, el peso molecular aparente no cambiará independientemente de si el enlazador que haya entre los tres se escinde en la conformación de tipo diacuerpo monocatenario debido a la unión no covalente entre VH y VL. Sin embargo, en el tipo scFv bivalente, cuando se escinde el enlazador central, se producirán especies moleculares que tendrán la mitad del peso molecular. Por lo tanto, se analizaron sc(Fv)₂ u2-wz4 hVB22B a granel, el pico 1 y el pico 2 cuyos enlazadores se escindieron
- 60 parcialmente por las condiciones de reacción mencionadas anteriormente mediante cromatografía de filtración en gel usando TSK Super SW2000 (TOSOH). La cromatografía de filtración en gel se realizó en las siguientes condiciones:
- 65 Fase móvil: DPBS (-), pH 7,4.
Caudal: 0,2 ml/min.

Como resultado de ello, como se muestra en la Fig. 17, los picos de los minicuerpos no se observaron en absoluto en el pico 2, mientras que, los picos de minicuerpos (aproximadamente la mitad del peso molecular) se observaron para el pico 1. sc(Fv)2 u2-wz4 hVB22B a granel, que es una mezcla del pico 1 y del pico 2, mostraron picos de bajo peso molecular, cuya cantidad corresponderá a la proporción de abundancia del pico 1. Por lo tanto, estos resultados identificaron el pico 1 como un tipo scFv bivalente y el pico 2 como un tipo diacuerpo monovalente.

Ejemplo 12. Preparación, análisis de isómeros conformacionales e identificación de sc(Fv)2 modificado en la superficie de contacto VH/VL

12-1. Preparación de sc(Fv)2 modificado en la superficie de contacto VH/VL

El sc(Fv)2 modificado en la superficie de contacto VH/VL se preparó siguiente mediante el método para confirmar si la formación de los isómeros conformacionales de sc(Fv)2 se podría regular a través de la regulación de la asociación mediante la modificación de la superficie de contacto VH/VL en sc(Fv)2, que es un minicuerpo.

Se modificaron Gln de la posición 39 de VH (posición 39 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; véase la SEQ ID NO: 289 del documento WO2005/56604) y Gln de la posición 38 de VL (posición 43 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; véase la SEQ ID NO: 289 del documento WO2005/56604), que son aminoácidos que forman la superficie de contacto VH/VL de u2-wz4 de la siguiente manera. En primer lugar, se produjo el gen de sc(Fv)2 u2-wz4 hVB22B (que se denomina, en lo sucesivo en el presente documento, v1; la secuencia de nucleótidos se muestra en SEQ ID NO: 15, y la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos se muestra en SEQ ID NO: 16), en la que Gln de la posición 39 de VH1 (codón genético: CAG) se modificó a Glu (codón genético: GAG), Gln de la posición 38 de VL2 (codón genético: CAG) se modificó a Glu (codón genético: GAG), Gln de la posición 39 de VH3 (codón genético: CAG) se modificó a Lys (codón genético: AAG) y Gln de la posición 38 de VL4 (codón genético: CAG) se modificó a Lys (codón genético: AAG). Además, se produjo el gen de sc(Fv)2 u2-wz4(v3) hVB22B (que se denomina, en lo sucesivo en el presente documento, v3; la secuencia de nucleótidos se muestra en SEQ ID NO: 17, y la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos se muestra en SEQ ID NO: 18), en la que Gln de la posición 39 de VH1 (codón genético: CAG) se modificó a Glu (codón genético: GAG), Gln de la posición 38 de VL2 (codón genético: CAG) se modificó a Lys (codón genético: AAG), Gln de la posición 39 de VH3 (codón genético: CAG) se modificó a Lys (codón genético: AAG) y Gln de la posición 38 de VL4 (codón genético: CAG) se modificó a Glu (codón genético: GAG). Se llevó a cabo la modificación del gen mediante la introducción de mutaciones puntuales usando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange (STRATAGENE) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Tras confirmar las secuencias de nucleótidos de cada uno de los genes, se prepararon las líneas celulares estables mediante la construcción de vectores de expresión por clonación de fragmentos de ADN en el vector de expresión pCXND3 y la introducción del gen en células CHO-DG44. La línea celular CHO productora de v1 y la línea celular CHO productora de v3 se establecieron de acuerdo con el método mostrado en el Ejemplo 11.

Se purificaron las moléculas monoméricas de las variantes v1 y v3 de acuerdo con el método del Ejemplo 11 usando la columna con proteína de fusión GST-MG10 inmovilizada. Los resultados de la cromatografía de filtración en gel mostrados en la Fig. 18 mostraron que, para las variantes v1 y v3, los dímeros y agregados de mayor tamaño disminuyeron en el sobrenadante de cultivo y la proporción de monómeros aumentó del 59 % (u2-wz4 antes de la modificación) al 89 % para v1 y al 77 % para v3. Parece que la modificación de los aminoácidos en la superficie de contacto VH/VL inhibe las asociaciones desfavorables por la repulsión de las cargas y potencia la asociación favorable en las variantes v1 y v3. Por consiguiente, se realizó la expresión eficaz de las moléculas monoméricas con éxito mediante dicha regulación de la asociación.

12-2. Análisis de isómeros conformacionales e identificación de sc(Fv)2 modificado en la superficie de contacto VH/VL

Las proporciones de los isómeros conformacionales presentes en la v1 y la v3 modificadas en la superficie de contacto VH/VL obtenidas, y en u2-wz4 sin modificar se analizaron mediante cromatografía de intercambio catiónico e isoelectroenfoque. Las conformaciones se identificaron mediante el método de la proteólisis limitada a la proteasa.

La cromatografía de intercambio catiónico se realizó de la siguiente manera:

Columna: TSK-gel Bioassist S, 4,6 mm Φ x 50 mm (TOSOH)

Caudal: 0,8 ml/min

Longitud de onda de detección: 220 nm

Condición de elución:

Eluyente A: 20 mmol/l de tampón fosfato (pH 7,0)

Eluyente B: 20 mmol/l de tampón fosfato / 500 mmol/l de NaCl (pH 7,0)

Gradiente:

Tiempo (minutos)	% de B
0	0
5	0

25	30
25,1	100
35	100
35,1	0

5 El isoelectroenfoco se realizó de la siguiente manera. El gel seco PhastGel IEF (Amersham Biosciences) se hinchó durante 30 minutos en la solución de hinchamiento de gel que se describe a continuación. En primer lugar, se aplicaron las muestras al gel hinchado, y se sometieron a electroforesis usando el PhastSystem en las siguientes condiciones. Tras la electroforesis, el gel se empapó durante 30 minutos en una solución de TCA al 20 %, después se sometió a un lavado de cinco minutos durante tres veces o más en agua milliQ, y después a tinción con Coomassie o tinción con plata, dependiendo de la concentración de proteínas de las muestras. En la tinción con Coomassie, se usó CBB al 0,02 % que contenía CuSO₄ al 0,1 % (p/v) como la solución para la tinción, y se usó metanol al 30 % que contenía ácido acético al 10 % para la decoloración. En la tinción con plata, se usó la proteína del kit de tinción de plata (Amersham Biosciences), y se realizó la tinción de acuerdo con el protocolo convencional unido al kit.

<Solución de hinchamiento del gel>

20	Pharmalyte 8.5-10	80 µl
	Biolyte 7-9	10 µl
	Biolyte 3-9	10 µl
	Glicerol al 20 %	2,0 ml

<Solución de hinchamiento del gel>

25	APLICACIÓN DE LA MUESTRA NEGATIVA en la etapa 2	0 Vh
	APLICACIÓN DE LA MUESTRA POSITIVA en la etapa 3	0 Vh
	Etapas 1 2.000 V 2,5 mA 3,5 W 15 °C	75 Vh
	Etapas 2 200 V 2,5 mA 3,5 W 15 °C	15 Vh
	Etapas 3 2.000 V 2,5 mA 3,5 W 15 °C	410 Vh

30 Las conformaciones se identificaron en las siguientes condiciones mediante el método de la proteólisis limitada a la proteasa. Se dejaron reaccionar el pico 1 purificado a partir de u2-wz4, el pico 2 purificado a partir de u2-wz4 y la variante v1 y la variante v3 usando subtilisina A en las siguientes condiciones:

35	Citrato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5
	Pico 1 o pico 2 de sc(Fv)2 u2-wz4 hVB22B: 0,15 mg/ml
	Subtilisina A: 10 µg/ml
	37 °C, 30 minutos.

Se analizó la solución de reacción obtenida mediante cromatografía de filtración en gel en las siguientes condiciones:

40	Columna: TSKgel Super2000sw (TOSOH)
	Eluyente: fosfato de sodio 50 mM, KCl 300 mM, pH 7,0
	Caudal: 0,2 ml/min
45	Detección: 220 nm.

A partir de los resultados del análisis de los isómeros conformacionales mediante cromatografía de intercambio catiónico y el isoelectroenfoco mostrado en las Fig. 19 y 20, resultó que u2-wz4 se expresaba como una mezcla de los dos isómeros conformacionales en la que el 24 % es el tipo scFv bivalente y el 76 % es el tipo diacuerpo monocatenario, mientras que el 100 % de la variante v1 se expresó como el isómero conformacional de tipo diacuerpo monocatenario y el 100 % de la variante v3 se expresó como el isómero conformacional de tipo scFv bivalente. Además, como se muestra en la Fig. 21, los resultados de la proteólisis limitada a la proteasa demostraron que los picos de minicuerpos se encuentran en la variante v3 como en el pico 1 purificado a partir de u2-wz4, y que los picos de minicuerpos están ausentes en la variante v1 como en el pico 2 purificado a partir de u2-wz4. Estos datos confirman que la variante v1 se expresa como un isómero conformacional de tipo diacuerpo monocatenario y la variante v3 se expresa como un isómero conformacional de tipo scFv bivalente.

Ejemplo 13. Evaluación de la actividad y evaluación de la estabilidad de sc(Fv)2 modificado en la superficie de contacto VH/VL

60 13-1. Evaluación de la actividad biológica de sc(Fv)2 modificado en la superficie de contacto VH/VL

Se ha informado en la bibliografía (*Blood* 2005; 105: 562-566) que el anticuerpo sc(Fv)2 VB22B anti-Mpl humano muestra actividad agonista de tipo TPO. Por consiguiente, se evaluó la actividad agonista de tipo TPO de los isómeros conformacionales separados usando BaF3-Mpl humana o BaF3-Mpl de mono que indica el crecimiento dependiente de TPO.

Cada célula se lavó dos veces con RPMI1640 (Invitrogen) que contenía suero bovino fetal al 1 % (Invitrogen), después se suspendieron en RPMI 1640 que contenía suero bovino fetal al 10 % a 4×10^5 células/ml y, a continuación, se dispensaron en una placa de 96 pocillos a 60 μ l/pocillo. Se añadieron 40 μ l de rTPO (R&D) o se añadió la muestra de isómeros conformacionales a cada pocillo a diversas concentraciones y las células se cultivaron a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 24 horas. Inmediatamente después de añadir el reactivo WST-8 (Cell Count Reagent SF, Nakalai Tesque) a 10 μ l/pocillo, se midió la absorbancia a 450 nm (control: 655 nm) en un Benchmark Plus, y se volvió a medir la absorbancia a 450 nm (control: 655 nm) tras cultivar durante 2 horas. Dado que el reactivo WST-8 muestra una reacción cromogénica a 450 nm en función del número de células viables, se evaluó la actividad agonista de tipo TPO usando el cambio en la absorción durante las 2 horas como indicador.

Los resultados de la evaluación de la actividad agonista de tipo TPO en BaF3-Mpl humana y BaF3-Mpl de mono usando el isómero conformacional sc(Fv)2 VB22B purificado se muestran individualmente en la Fig. 22. La comparación de la actividad agonista de los isómeros conformacionales del pico 1 y del pico 2 indicó que el pico 2 poseía una actividad significativamente superior. Esto sugirió que para que el anticuerpo anti-Mpl sc(Fv)2 ejerza la actividad agonista de tipo TPO, tiene que formar una conformación de diacuerpo monocatenario.

De acuerdo con el método indicado en el Ejemplo 1, se evaluó la actividad agonista de v1 y v3 modificadas en la superficie de contacto VH/VL. La actividad agonista difiere en gran medida entre los isómeros conformacionales, y como se muestra en la Fig. 12, el pico 2, que tiene una conformación de diacuerpo monocatenario, mostró una actividad agonista muy alta, mientras que la actividad del pico 1, que tiene una conformación de scFv bivalente, se redujo significativamente. Como se muestra en la Fig. 22, la variante v1 mostró la misma actividad que el pico 2, y la variante v3 mostró casi la misma actividad que el pico 1. Por consiguiente, las actividades biológicas también confirmaron que la variante v1 formó una conformación de diacuerpo monocatenario, y la variante v3 forma una conformación de scFv bivalente.

13-2. Evaluación de la estabilidad de sc(Fv)2 modificado en la superficie de contacto VH/VL

Para evaluar la estabilidad del pico 1 purificado a partir de u2-wz4, del pico 2 purificado a partir de u2-wz4, de la variante v1 y de la variante v3, se midió la temperatura de transición de la desnaturalización (valor de T_m) usando calorimetría diferencial de barrido en las siguientes condiciones.

DSC: N-DSCII (Applied Thermodynamics)
 Condiciones de elución: citrato de sodio 20 mM, NaCl 300 mM, pH 7,0
 Concentración de proteína: 0,1 mg/ml
 Velocidad de barrido: 1 °C/minuto.

Los resultados de las respectivas mediciones de DSC se muestran en la Fig. 23. Los valores de T_m para el pico 2 purificado a partir de uw-wz4 y la variante v1 resultaron tener casi los mismos valores de T_m que la forma no modificada, y sus estabilidades resultaron ser las mismas. Entre el pico 1 purificado a partir de u2-wz4 y la variante v3, la variante v3 mostró una estabilidad ligeramente inferior. Como ejemplo de la regulación de la superficie de contacto realizada de acuerdo con los métodos que utilizan la técnica de botón en ojal, hay un informe en el que (*Acta. Pharmacol. Sin.* 2005 26(6): 649-58), en la asociación heteróloga de los dominios CH3 de IgG, el valor de T_m para el dominio CH3 no modificado es de 80,4 °C, mientras que el valor de T_m para el dominio CH3 modificado es de 69,4 °C, y el valor de T_m se reduce en una gran cantidad y la estabilidad disminuye. Por el contrario, se confirmó que la asociación se puede regular sin reducir la estabilidad.

A continuación, se realizó la evaluación de la estabilidad mediante ensayos de aceleración térmica en las siguientes condiciones en el pico 1 purificado a partir de u2-wz4 y el pico 2 purificado a partir de u2-wz4, y en las variantes v1 y v3 modificadas en la superficie de contacto VH/VL.

<Condiciones de aceleración térmica>
 Condiciones de la solución: citrato de sodio 20 mM, pH 6,0
 Concentración de proteína: 0,25 mg/ml
 Condiciones de aceleración: 40 °C - 6 días, 12 días.

Se analizaron las muestras aceleradas mediante cromatografía de filtración en gel y cromatografía de intercambio catiónico en las siguientes condiciones.

Como se muestra en la Fig. 24, los resultados del análisis de cromatografía de filtración en gel confirmaron que la tasa de recuperación de monómero es casi igual para el pico 2 purificado a partir de u2-wz4 y la variante v1, y la estabilidad de la asociación fue casi la misma. La tasa de recuperación de monómero también fue casi la misma para el pico 1 purificado a partir de u2-wz4 y la variante v3, y la estabilidad de asociación fue casi la misma en ambos isómeros conformacionales.

Como se indica en la Fig. 25, como resultado del análisis de cromatografía de intercambio catiónico, el pico 1 purificado en la forma no modificada se isomerizó al pico 2 mediante una reacción de isomerización, y el pico 2

purificado en forma no modificada se isomerizó al pico 1 mediante una reacción de isomerización, mientras que las v1 y v2 modificadas en la superficie de contacto VH/VL no sufrieron reacción de isomerización, incluso tras la aceleración térmica. Se encontró que la aplicación de modificaciones en la superficie de contacto VH/VL permite solo la expresión de uno de los dos tipos de isómeros conformacionales al 100 %, y además, los respectivos isómeros conformacionales obtenidos no sufren reacción de isomerización y se pueden almacenar de forma estable.

El presente ejemplo demostró que solamente uno de los dos tipos de isómeros conformacionales se puede expresar al 100 % mediante el uso de las modificaciones en la superficie de contacto VH/VL aplicadas a v1 y v3. Un método conocido para la regulación de la superficie de contacto VH/VL para la obtención de un anticuerpo monocatenario que tenga la conformación de interés es un método de regulación de las conformaciones de diacuerpos biespecíficos usando la técnica de los botones en ojales (*Protein Sci.* abril de 1997; 6(4):781-8, "Remodeling domain interfaces to enhance heterodimer formation", Zhu Z., Presta L. G., Zapata G., Carter P.). Se ha informado que este método aumenta el porcentaje de formación de la conformación heterodimérica de interés del 72 % al 92 % mediante la modificación de aminoácidos en un total de cuatro posiciones por superficie de contacto VH/VL. Por el contrario, la presente invención obtuvo con éxito la conformación de interés al 100 % y sin reducir la estabilidad térmica ni la estabilidad del isómero conformacional mediante la modificación de los aminoácidos en cuatro posiciones.

Ejemplo 14. Humanización del anticuerpo biespecífico portador de una cadena L híbrida

El anticuerpo biespecífico (solicitud de patente japonesa n.º 2005-112514), compuesto de una combinación de anticuerpo A69-VH anti-Factor IXa, anticuerpo B26-VH anti-Factor X y la cadena L híbrida (BBA), que era el más eficaz en acortar el tiempo de coagulación sanguínea, se sometió a humanización de la siguiente manera.

14-1. Búsqueda por homología de anticuerpos humanizados

Usando una base de datos construida obteniendo datos de secuencias de aminoácidos de anticuerpos humanos a partir de la base de datos Kabat divulgada públicamente (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>) y la base de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr/>), se llevó a cabo la búsqueda por homología por separado para la región variable de la cadena H de A69 de ratón (secuencia de aminoácidos; SEQ ID NO: 57), región variable de la cadena H de B26 de ratón (secuencia de aminoácidos; SEQ ID NO: 58) y la región variable de la cadena L de BBA de ratón (secuencia de aminoácidos; SEQ ID NO: 59). Los resultados confirmaron que tienen homologías altas para las secuencias de anticuerpos humanos mostradas a continuación, y por tanto, se decidió que se iban a usar como regiones marco conservadas (abreviadas como FR en lo sucesivo en el presente documento) de los anticuerpos humanizados.

(1) región variable de la cadena H de A69: KABATID-000064 (base de datos Kabat) (Kipps *et al.*, *J. Clin. Invest.* 1991; 87:2087-2096);

(2) región variable de la cadena H de B26: n.º de acceso EMBL AB063872 (base de datos IMGT) (datos no publicados);

(3) región variable de la cadena L de BBA: KABATID-024300 (base de datos Kabat) (Welschof *et al.*, *J. Immunol. Method* 1995; 179:203-214).

Se prepararon anticuerpos humanizados en los que se injertaron regiones determinantes de la complementariedad (abreviadas en lo sucesivo en el presente documento CDR) de cada anticuerpo de ratón en las FR de los anticuerpos humanos (1)-(3).

Además, se usó la búsqueda por homología en Internet desvelada públicamente por NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para buscar secuencias señal secretoras de anticuerpos humanos que fueran altamente homólogas a los anticuerpos humanos de (1)-(3). Se usaron las siguientes secuencias señal secretoras obtenidas por la búsqueda.

(1) región variable de la cadena H de A69: n.º de acceso de GenBank AF062257;

(2) región variable de la cadena H de B26: n.º de acceso de GenBank AAC18248;

(3) región variable de la cadena L-BBA: n.º de acceso de GenBank AAA59100.

14-2. Construcción del vector de expresión génica de anticuerpo humanizado

Se prepararon doce oligoADN sintéticos de aproximadamente 50 bases a partir de una secuencia de nucleótidos codificante de la secuencia de aminoácidos de la secuencia señal secretora a la región variable del anticuerpo, de modo que aproximadamente 20 bases de su extremo 3' se hibridaron entre sí. Además, se prepararon un cebador que se hibrida al extremo 5' de un gen de la región variable del anticuerpo y que tiene la secuencia de escisión de XhoI, y un cebador que se hibrida al extremo 3' de un gen de la región variable del anticuerpo, que tiene la secuencia de escisión de SfiI y que codifica también la secuencia del extremo 5' del intrón.

Se mezcló 1 µl de cada uno de los oligoADN sintéticos preparados a 2,5 µM, y se añadieron 1x tampón TaKaRa Ex Taq, dNTP 0,4 mM y 0,5 unidades de TaKaRa Ex Taq (todos de Takara Shuzo) para preparar 48 µl de una solución

de reacción. Tras mantener esto a 94 °C durante 5 minutos, se realizaron 2 ciclos de reacción a 94 °C durante 2 minutos, 55 °C durante 2 minutos y 72 °C durante 2 minutos para montar y alargar cada uno de los oligoADN sintéticos. A continuación, se añadió 1 µl de cebador (10 µM de cada) que se hibrida al extremo 5' y 1 µl de cebador que se hibrida al extremo 3' del gen del anticuerpo, y se amplificaron los genes de la región variable del anticuerpo mediante 35 ciclos de reacción a 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 min, y después con reacción a 72 °C durante 5 minutos. Tras la PCR, la cantidad total de la solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se purificaron los fragmentos amplificados que tenían el tamaño de interés (aproximadamente 400 pb) usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones, y se eluyeron con 30 µl de agua estéril. Se clonaron estos fragmentos usando el sistema de vectores pGEM-T Easy (Promega) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones. Se determinó la secuencia de nucleótidos de cada uno de los fragmentos de ADN usando el kit de secuenciación BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) y el secuenciador de ADN ABI PRISM 3700xL (Applied Biosystems) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones.

El plásmido insertado con el fragmento de la región variable de la cadena H y el plásmido insertado con el fragmento de la región variable de la cadena L, de los que cada uno se confirmó que tenía una secuencia génica de la región variable del anticuerpo humanizado correcta, se digirieron con XhoI y SfiI, y EcoRI, respectivamente. A continuación, se sometió la solución de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se purificaron los fragmentos de ADN que tenían el tamaño de interés (aproximadamente 400 pb) usando el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones, y se eluyeron con 30 µl de agua estéril. A continuación, se prepararon los vectores de expresión para células animales de la siguiente manera. Para expresar preferentemente la IgG4 con cadenas H que son de combinación heteróloga, se usó una IgG4 sustituida con aminoácido con parte CH3 en referencia a la técnica de "botones en ojales" de IgG1 (Documento no de patente 3). Además, para potenciar la formación del dímero de la cadena H, también se introdujo una sustitución de aminoácidos (-ppcpScp→ -ppcpPcp-) a la bisagra. Se preparó el vector de expresión de cadena H de A69 humanizado insertando un fragmento génico de la región variable de cadena H del anticuerpo A69 humanizado en un vector de expresión preparado insertando el gen de la región constante con sustitución de Y349C y T366W a pCAGGS que comprende un promotor de β-actina de pollo (Niwa *et al.*, 1991 *Gene* 108:193-199). Se preparó un vector de expresión de cadena H de B26 humanizado insertando un fragmento génico de región variable de cadena H del anticuerpo B26 humanizado en un vector de expresión preparado insertando el gen de la región constante con sustitución de E356C, T366S, L368A y Y407V a pCAGGS. Se digirió el plásmido (pCAG-gkDNA) preparado insertando una región constante de cadena L de anticuerpo de tipo silvestre en pCAGGS con EcoRI para preparar vectores de expresión insertados con el fragmento génico de la región variable de cadena L del anticuerpo BBA humanizado. Se realizó una reacción de ligamiento usando el kit de ligamiento de ADN Rapid (Roche Diagnostics), y se transformó la cepa DH5α de *E. Coli* (TOYOBO).

14-3. Preparación de anticuerpos biespecíficos humanizados

Los anticuerpos biespecíficos humanizados se expresaron de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 4-2 o de acuerdo con el siguiente método. Se suspendió la cepa HEK293H derivada de células de carcinoma renal fetal humano (Invitrogen) en medio DMEM (Invitrogen) que contenía FCS al 10 % (Invitrogen), y se sembraron 10 ml de esto a una densidad celular de 5-6 x 10⁵ células/ml en cada placa usada por células adhesivas (10 cm de diámetro, CORNING) y se cultivó durante un día y una noche en una incubadora de CO₂ (37 °C, CO₂ al 5 %). A continuación, se retiró el medio por aspiración, y se añadieron 6,9 ml de medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen). Se mezcló la solución de mezcla de ADN plasmídico preparada en 14-2 (total de 13,8 µg) con 20,7 µl de 1 µg/ml de polietilimina (Polisciencias Inc.) y 690 µl de medio CHO-S-SFMII, se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos, a continuación se sembraron las células en cada placa y se incubaron en una incubadora de CO₂ (37 °C, CO₂ al 5 %) durante 4-5 horas. A continuación, se añadieron 6,9 ml de medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen) y, a continuación, se incubaron las células en una incubadora de CO₂ durante 3 días. Se recuperó el sobrenadante de cultivo, a continuación, se retiraron las células por centrifugación (aproximadamente a 2.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente), y se esterilizó la solución pasándola a través de un filtro MILLEX®-GV de 0,22 µm (Millipore). La muestra se almacenó a 4 °C hasta su uso.

A continuación, se purificaron los anticuerpos de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 4-4, y se cuantificó la concentración de anticuerpos de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 4-5 o de acuerdo con el siguiente método. Se inmovilizó proteína A sobre un chip sensor CM5 (BIAcore) usando BIAcore3000 (BIAcore). Más concretamente, el chip sensor con la proteína A inmovilizada se preparó de acuerdo con el protocolo del fabricante mediante la reacción de un chip sensor activado con una solución de proteína A diluida a 50 µg/ml con una solución acuosa de acetato de sodio 10 mM (pH 4,0, BIAcore) a 5 µl/min durante 30 minutos, y después realizando una operación de bloqueo. Este chip sensor se usó para medir la concentración del sobrenadante del cultivo y el producto se purificó usando BIAcore Q. Se usó tampón HBS-EP (BIAcore) para la inmovilización del chip sensor y para las mediciones de la concentración. Como patrón para las mediciones de la concentración, se usó IgG4 humana (anticuerpo anti-TF humanizado, véase el documento WO 99/51743) diluida con tampón HBS-EP en una dilución en serie con factor de dilución de dos hasta seis etapas comenzando a 2.000 ng/ml.

14-4. Evaluación de la actividad de los anticuerpos biespecíficos humanizados y modificación de la secuencia de anticuerpo

Para evaluar las capacidades de coagulación del plasma del anticuerpo biespecífico humanizado preparado y del anticuerpo biespecífico quimérico (A69/B26/BBA), se examinaron los efectos de los anticuerpos sobre APTT usando plasma deficitario en F. VIII de acuerdo con el método del Ejemplo 5. Se sometió un anticuerpo biespecífico humanizado cuya capacidad de coagulación sanguínea había disminuido a modificaciones de aminoácidos en la FR del anticuerpo humano para aumentar su actividad. Durante la expresión y la secreción de 3 tipos de anticuerpos, se expresaron anticuerpo A69 humanizado/BBA humanizado, anticuerpo B26 humanizado/BBA humanizado y anticuerpo biespecífico A69 humanizado/B26 humanizado/BBA humanizado, se separaron estos 3 tipos de anticuerpos, y se llevaron a cabo modificaciones de aminoácidos que reducen el punto isoeléctrico de la región variable de la cadena H de A69 humanizado y aumentan el punto isoeléctrico de la región variable de la cadena H de B26 humanizado para purificar el anticuerpo biespecífico solo. En concreto, las mutaciones se introdujeron en la región variable del anticuerpo humanizado usando un kit de mutagénesis dirigida QuikChange (Stratagene) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones. El plásmido insertado con el fragmento de la región variable de la cadena H y el plásmido insertado con el fragmento de la región variable de la cadena L, de los que cada uno se confirmó que tenía la secuencia génica de la región variable del anticuerpo humanizado, se digirieron con XhoI y SfiI, y EcoRI, respectivamente. A continuación, se sometió la solución de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se purificaron los fragmentos de ADN que tenían el tamaño de interés (aproximadamente 400 pb) usando el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones, y se eluyeron con 30 µl de agua estéril. A continuación, se prepararon los vectores de expresión para células animales de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 14-2. El anticuerpo biespecífico humanizado se preparó de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 14-3, y se evaluó la actividad de coagulación sanguínea de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 5.

Al repetir las modificaciones de aminoácidos de las secuencias de FR y la evaluación de la capacidad de coagulación sanguínea, se obtuvo el anticuerpo biespecífico humanizado (A69 humanizado (hA69-PFL)/B26 humanizado (hB26-PF)/BBA humanizado (hAL-AQ)) que tenía el mismo nivel de actividad que el anticuerpo biespecífico quimérico (A69/B26/BBA) (Fig. 26). Cada una de las secuencias de la región variable del anticuerpo se indica en las siguientes SEQ ID NO.

- (1) VH de anticuerpo A69 humanizado (hA69-PFL) SEQ ID NO: 19 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 20 (secuencia de aminoácidos);
- (2) VH de anticuerpo B26 humanizado (hB26-PF) SEQ ID NO: 21 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 22 (secuencia de aminoácidos);
- (3) VL de anticuerpo BBA humanizado (hAL-AQ) SEQ ID NO: 23 (secuencia de nucleótidos), SEQ ID NO: 24 (secuencia de aminoácidos).

Ejemplo 15. Selección de posiciones de modificación de aminoácidos en la región constante para mejorar la eficacia de formación de un anticuerpo biespecífico

Con el objetivo de aumentar la eficacia de formación de un anticuerpo biespecífico, un heterodímero, mediante el uso de la repulsión entre cargas, se llevaron a cabo exámenes mediante la modificación de los aminoácidos presentes en la superficie de contacto de CH3 de la región constante. En primer lugar, a partir de la estructura cristalina de la región CH3 (banco de datos de proteínas, código PDB 10QX), se buscaron pares de aminoácidos que interactuaran electrostáticamente durante la formación del homodímero de CH3. Como resultado de ello, en la superficie de contacto, durante la formación del homodímero de CH3, 3 pares, las posiciones 356 y 439, las posiciones 357 y 370, y las posiciones 399 y 409 de la cadena H (los números se basan en el sistema de numeración de la UE (Kabat EA *et al.*, 1991. Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico. NIH)) resultaron interactuar electrostáticamente, donde cada uno de los aminoácidos portan una carga positiva y una carga negativa, y se seleccionaron estas como las posiciones de modificación. Se postuló que la formación del heterodímero se potenciaría mediante un método de modificación que llevara a cabo una modificación mediante el cambio de carga de pares de aminoácidos cargados positiva y negativamente. El principio de dicha regulación se describe en la Fig. 27. Los experimentos también se realizaron con modificaciones que introducen simultáneamente enlaces disulfuro a la superficie de contacto de CH3. Las posiciones de los aminoácidos modificados se resumen en la Tabla 1.

Ejemplo 16. Modificaciones de aminoácidos en la superficie de contacto de la región constante CH3 del anticuerpo biespecífico humanizado

Para modificar los aminoácidos en la superficie de contacto de CH3 de la región constante de cadena H seleccionada en el Ejemplo 15, se realizó la siguiente operación. Se amplificó cada región constante de cadena H mediante PCR usando genes de la región constante de cadena H de IgG1 humana y de IgG4 humana como moldes y usando un cebador del extremo 5' diseñado de manera que la secuencia de nucleótidos codificante de dos aminoácidos (Ala-Ser) en el lado N-terminal de la región constante de cadena H fuera una secuencia de reconocimiento de NheI (GCTAGC), y un cebador que se hibrida con el extremo 3' y que porta un sitio de reconocimiento de NotI. A continuación, se prepararon pBCH (que comprende un gen de la región constante de

IgG1) y pBCH4 (IgG4 que comprende un gen de la región constante) ligados a un vector preparado mediante la digestión del vector pBluescriptKS+ (TOYOBO) con NheI y Not I (ambos de TaKaRa). Se realizó la PCR usando un cebador complementario a la secuencia de nucleótidos del extremo 5' de la región variable de cadena H del anticuerpo A69 humanizado y del anticuerpo B26 humanizado, y que tiene una secuencia de Kozak (CCACC) y una secuencia de reconocimiento de EcoRI, y una cebador en la secuencia de nucleótidos del extremo 3' que tiene una secuencia de reconocimiento de NheI, y se insertaron los productos de PCR obtenidos en pBCH o pBCH4 digeridos con EcoRI y NheI (ambos de TaKaRa), y se unieron las regiones variables y las regiones constantes. A continuación, para modificar los aminoácidos presentes en la superficie de contacto de CH3 de la región constante de cadena H, se introdujeron mutaciones en las regiones constantes de cadena H usando el kit de mutagénesis dirigida QuikChange (Stratagene) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones. Se confirmó que el plásmido insertado con el fragmento de gen de cadena H tenía la secuencia génica de la región constante de cadena H, y después se digirió con EcoRI y NotI (ambos de TaKaRa). Se sometió la solución de reacción a electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Se purificaron los fragmentos de genes de cadena H que tenían el tamaño de interés (aproximadamente 1.400 pb) usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones, y se eluyeron con 30 µl de agua estéril. A continuación, los fragmentos se insertaron en pCAGGS digerido con EcoRI y NotI para preparar plásmidos de expresión. La preparación de anticuerpos biespecíficos humanizados se realizó siguiendo el método descrito en el Ejemplo 14-3. Las posiciones de los aminoácidos modificados se resumen en la Tabla 1. Se empleó el sistema de numeración de la UE (Kabat EA *et al.*, 1991. Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico. NIH) para los números de las posiciones modificadas que se muestran en la Tabla 1. El alfabeto en frente del número de la posición modificada es la representación con código de una letra para el aminoácido antes de la modificación, y el alfabeto detrás del número indica la representación del código de una letra del aminoácido después de la modificación.

Tabla 1

	Nombre	Región constante de cadena H del anticuerpo A69 humanizado		Región constante de cadena H del anticuerpo A26 humanizado	
		Posición modificada	SEQ ID NO: del aminoácido	Posición modificada	SEQ ID NO: del aminoácido
IgG4	Tipo silvestre		25	-	25
	KiH	Y349C, T366VV	9	E356C, T366S, L368A, Y407V	11
	s1	R409D	26	D399K	27
	s2	K370E	28	E357K	29
	s3	K439E	30	E356K	31
	w1	R409D, K370E	32	D399K, E357K	33
	w2	R409D, K439E	34	D399K, E356K	35
	w3	K370E, K439E	36	E357K, E356K	37
	S1C	R409D, Y349C	38	D399K, S354C	39
	S2C	K370E, Y349C	40	E357K, S354C	41
	S3C	K439E, Y349C	42	E356K, S354C	43
	W3C	K370E, K439E, Y349C	44	E357K, E356K, S354C	45
W3C2	K370E, K439E, S354C	46	E357K, E356K, Y349C	47	
IgG1	Tipo silvestre	-	48	-	48
	KiH	Y349C, T366W	49	D356C, T366S, L368A, Y407V	50
	w1	R409D, K370E	51	D399K, E357K	52
	w2	R409D, K439E	53	D399K, E356K	54
	w3	K370E, K439E	55	E357K, E356K	56

En la tabla mostrada anteriormente, KiH indica la variante descrita en el Documento no de patente 3 preparado usando la técnica de botones en ojales.

Ejemplo 17. Evaluación de la eficacia de la formación y de la estabilidad de los anticuerpos biespecíficos modificados en la superficie de contacto de CH3 (de tipo IgG4)

Se analizaron IgG4 de tipo silvestre, KiH, s1, s2, s3, w1, w2, w3, s1C, s2C, s3C, w3C y w3C2 mediante cromatografía de intercambio catiónico (IEX), y se evaluó la eficacia de la formación de los anticuerpos biespecíficos (denominados en lo sucesivo en el presente documento BiAb). Las condiciones para el análisis cromatográfico de intercambio catiónico fueron las siguientes, y se calculó la proporción de las áreas de los picos de A-Homo, un homodímero del anticuerpo A69 humanizado, BiAb, un heterodímero del anticuerpo A69 humanizado y un anticuerpo B26 humanizado, y B-Homo, un homodímero de anticuerpo B26 humanizado.

Columna: ProPac WCX-10, 4 x 250 nm, (Dionex)

Fase móvil: A: 10 mmol/l de NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 6,25

B: 10 mmol/l de NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 500 mmol/l de NaCl, pH 6,25

Caudal: 1,0 ml/min

Gradiente: B al 10 % (5 min) → (40 min) → B al 60 % → (5 min) → B al 100 % (5 min)
 Detección: 220 nm.

5 Para el tipo silvestre, KiH, s2, s3, s1C, s2C, s3C, w3C y w3C2, los BiAb se purificaron mediante la recogida de las fracciones de los picos de los BiAb de los análisis IEX descritos anteriormente. Las fracciones de los BiAb se concentraron usando Amicon Ultra, MWCO 10.000 (Millipore), después se sometieron a diálisis durante la noche frente a acetato de sodio 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0, mientras se enfriaba y después se extrajeron. Se hicieron uniformes las concentraciones BiAb a 0,1 mg/ml, las muestras iniciales y las muestras a 60 °C durante una semana (60 °C-1 semana) se dispensaron individualmente en viales por duplicado, y se realizaron los ensayos de estabilidad en las muestras a 60 °C durante 1 semana. Se realizó el análisis de cromatografía de filtración en gel (SEC), y se calculó la tasa de recuperación del pico de monómero (área del pico de monómero de la muestra a 60 °C durante 1 semana/área del pico de monómero de la muestra inicial x 100). Las condiciones para los análisis cromatográficos de filtración en gel fueron las siguientes:

15 Columna: Super3000 (TOSOH)
 Fase móvil: fosfato de sodio 50 mM, KCl 300 mM, pH 7,0
 Caudal: 0,2 ml/min
 Detección: 220 nm.

20 Los cromatogramas IEX de la IgG4 de tipo silvestre, s1, s2, s3 y w1 se muestran en la Fig. 28, y los porcentajes de formación de A-Homo, BiAb y B-Homo por el tipo silvestre, KiH, s1, s2, s3, w1, w2, w3, s1c, s2C, s3C, w3C y w3C2 se muestran en la Fig. 29. Las tasas de recuperación de monómero tras 60 °C durante una semana se muestran en la Fig. 30.

25 Como se muestra en las Fig. 28 y 29, la eficacia de la formación de BiAb prevista mejoró en gran medida en comparación con el tipo silvestre para cada una de las variantes de superficie de contacto de CH3 modificada que se encuentran en el presente ejemplo. Dado que CH3 está en la región constante, al realizar modificaciones en los aminoácidos nativos, las posiciones modificadas se mantienen deseablemente al mínimo desde el punto de vista de la antigenicidad. Para la introducción de los botones y los ojales, en KiH, se modifica un total de cuatro posiciones en ambas cadenas H y, además, se modifican dos posiciones para la introducción de enlaces de disulfuro, y se modifica un total de seis posiciones. Por lo tanto, como se muestra en la Fig. 29, la eficacia de la formación de BiAb es alta. Sin embargo, los resultados de los ensayos de estabilidad mostrados en la Fig. 30 muestran que la estabilidad térmica se reduce significativamente en comparación con el tipo silvestre a pesar de que se introduce un enlace disulfuro. Para desarrollar anticuerpos en productos farmacéuticos médicos, se necesitan formulaciones estables y, por lo tanto, es más deseable una mayor estabilidad térmica.

Por otra parte, cada una de las variantes de superficie de contacto de CH3 modificada encontradas en el presente ejemplo tuvo éxito en mejorar considerablemente la eficacia de la formación de BiAb prevista en comparación con el tipo silvestre. Entre estas variantes, por ejemplo, se consiguió una eficacia de formación de BiAb alta, del 90 % o superior mediante la modificación de s2, s3, w1, w2, w3 y s1C en un total de dos o cuatro posiciones que es inferior en comparación con KiH (seis posiciones modificadas), cuyo riesgo de antigenicidad se considera bajo. Además, los resultados de los ensayos de estabilidad mostrados en la Fig. 30 mostraron que, entre las variantes, por ejemplo, s2, s3, w3, w3C y w3C2 tienen una alta eficacia en la formación BiAb, del 90 % o superior, y también tienen mayor estabilidad térmica (mayor porcentaje de recuperación de monómero) que KiH, y s3, s2c, s3C, w3C y w3C2 tienen estabilidad térmica mucho mayor que el tipo silvestre, y serán útiles para el desarrollo de formulaciones farmacéuticas estables.

El presente ejemplo demostró que mediante la modificación de los aminoácidos en las posiciones de cadena H 356, 357, 370, 399, 409 y 439 de la superficie de contacto de CH3 para introducir la repulsión molecular inducida por la carga, se podría mejorar en gran medida la eficacia de la formación de BiAb prevista. También mostró que mediante la introducción de enlaces disulfuro y dichas modificaciones de forma individual o en combinación, la eficacia de la formación de BiAb se podría mejorar en gran medida con un menor número de modificaciones que en KiH, y que la eficacia de la formación de BiAb se podría mejorar en gran medida con la estabilidad más alta que en KiH, y aún más con una estabilidad térmica más alta que en el tipo silvestre.

55 **Ejemplo 18.** Evaluación de la actividad de coagulación de los anticuerpos biespecíficos de superficie de contacto de CH3 modificada

Se evaluó la actividad de coagulación de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 5, usando anticuerpos biespecíficos de tipo IgG4 modificados en la superficie de contacto de CH3 (s1, s2, s3, w1, w2 y w3) purificados en el Ejemplo 16. Como se muestra en la Fig. 31, ya que la actividad de coagulación no cambió incluso cuando se modificaron los aminoácidos en la superficie de contacto de CH3 de la región constante, la modificación de los aminoácidos de la superficie de contacto de CH3 mostraron no afectar a la estructura de las regiones variables implicadas en la reacción con los antígenos.

65 **Ejemplo 19.** Evaluación de la eficacia en la formación de anticuerpos biespecíficos modificados en la superficie de

contacto de CH3 (de tipo IgG1)

Se analizaron IgG1 de tipo silvestre, KiH, w1, w2 y w3 mediante cromatografía de intercambio catiónico (IEX), y se evaluó la eficacia de la formación de los BiAb. Las condiciones para el análisis cromatográfico de intercambio catiónico son las siguientes, y se calculó la proporción de las áreas de los picos de A-Homo, un homodímero del anticuerpo A69 humanizado, BiAb, un heterodímero de anticuerpo A69 humanizado y un anticuerpo B26 humanizado, y B-Homo, un homodímero de anticuerpo B26 humanizado.

Columna: ProPac WCX-10, 4 x 250 nm, (Dionex)

Fase móvil: A: 10 mmol/l de NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, pH 6,25

B: 10 mmol/l de NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 500 mmol/l de NaCl, pH 6,25

Caudal: 1,0 ml/min

Gradiente: B al 10 % (5 min) → (40 min) → B al 60 % → (5 min) → B al 100 % (5 min)

Detección: 220 nm.

Los porcentajes de formación de A-Homo, BiAb y B-Homo por IgG1 de tipo silvestre, KiH, w1, w2 y w3 se muestran en la Fig. 32. Al igual que el tipo IgG4, la eficacia de la formación de BiAb prevista mejoró en gran medida en cada uno de ellos en comparación con el tipo silvestre. Como en los tipos IgG4, se logró una alta eficacia de formación de BiAb, del 90 % o superior, mediante la modificación de cuatro posiciones, que es inferior a la de KiH, y el riesgo de antigenicidad se considera bajo. El presente ejemplo mostró que el método de modificación de los aminoácidos en las posiciones 356, 357, 370, 399, 409 y 439 de la cadena H de la superficie de contacto de CH3 se pueden aplicar no solo a la subclase IgG4 de la región constante del anticuerpo, sino también a IgG1, y es aplicable a los anticuerpos IgG en general.

Aplicabilidad Industrial

Dado que la presente divulgación solo requiere un pequeño número de sustituciones de aminoácidos, los métodos de la presente divulgación encuentran una utilidad excepcional en la regulación de la asociación sin cambiar la estructura ni la función (actividad) de los polipéptidos originales. Por lo tanto, hay poco efecto sobre la antigenicidad.

Por consiguiente, siguiendo los métodos de la presente divulgación, se pueden obtener anticuerpos biespecíficos que mantienen realmente la actividad de manera eficaz.

Listado de secuencias

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Método de preparación de moléculas deseadas que comprenden polipéptidos mediante la inhibición de la interacción entre los polipéptidos

<130> C1-A0415Y1P

<150> JP 2005-101105

<151> 31-03-2005

<150> JP 2005-378266

<151> 28-12-2005

<160> 59

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 423

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 1

ES 2 592 271 T3

atgaaacacc tgtggttctt cctcctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtctcag 60
 gtgcagctgc agcagtcagg acctggcctc gtgaaacctt ctgagactct gtctctcacc 120
 tgcactgtct ctggctactc catctccagt ggttattact ggacctggat ccggcagcct 180
 ccaggaaagg gtctggaatg gattggctac atatccttcg acggtaccaa tgactacaac 240
 ccatctctca aaaatcgagt caccatctct cgtgacacat ctaagaacaa tttttccctg 300
 aagttgaact ctgtaactgc tgcagacaca gctgtatatt actgtgcaag agggcccccc 360
 gctacttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctt caggtaatgc ggctcgggg 420
 gcc 423

<210> 2
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 2

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

<210> 3
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 3

ES 2 592 271 T3

atggacatga ggggtcccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
 agatgtgaaa ttgtgttgac gcagctctcca tctcctctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
 gtcacatca cttgcagggc cacctcaagt gtaaattaca tttactggta tcagcagaaa 180
 ccagggaaag cccctaagct cctgatctat tatacatcca acctggctcc tgggggtccca 240
 tcaaggttca ggggcagtg atctgggaca gatttcactc tcacatcaa cagcctgcag 300
 cctgaagatt ttgcaacta ctattgccag cagttttcta gttcccatg gacgttcggc 360
 ggagggacca agctggagat caaa 384

<210> 4
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 4

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

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

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

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Ser Ser Ser Pro Trp Thr
85 90 95

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

<210> 5
 <211> 443
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 5

ES 2 592 271 T3

atggactgga cctggagggt cttctgcttg ctggctgtag ctccaggtgc tcaactcccag 60
 gtgcagctgg tgcagctctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtttcc 120
 tgcaaggcat ctggatacac cttcaccacac tttgttttgc actgggtgcg acaggcccct 180
 ggacaagggc ttgagtggat gggatatatt attccttaca atgatggtag taagtacaat 240
 gagaagttca aaggcagagt caccatgacc agtgacacgt ccacgagcac agtctacatg 300
 gagctgagca tcttgaatc tgaggacacg gccgtgtatt tctgtgcgag agggaatagg 360
 tacgacgtag gttcctatgc tatggaactac tggggccaag ggaccaaggt cacogtctca 420
 tcaggttaagt ggctcggggg gcc 443

<210> 6
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 6

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	His	Phe
		20					25						30		
Val	Leu	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Tyr	Ile	Ile	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
	50					55						60			
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Ser	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Val	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ile	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Gly	Asn	Arg	Tyr	Asp	Val	Gly	Ser	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp
			100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Ser	Val	Ser	Ser					
		115						120							

<210> 7
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 7

atggtgttgc agaccaggt cttcatttct ctggtgctct ggatctctgg tgcctacggg 60
gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctggggca gagggccacc 120
atcaactgca agtccagtca gagcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 180
tgggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgctca tttactgggc atccactagg 240
gaatctgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcaag 300
atcagcccg tgcaggctga agatgtggga gtttattact gtcagcaata ttatagttt 360
ccgtacacgt tgggaggagg gaccaaggtg gagatcaaa 399

<210> 8
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 8

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Gln Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Arg Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 9
<211> 327
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

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

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
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 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Trp 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

<211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 10

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

<210> 11
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 11

15

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

ctctccctgc ccgtaacccc tggagagccg gcctccatct cctgcaggtc tagtaagagt 540
 ctctgcata gtaatggcaa cacttacttg tattggttcc tgcagaagcc agggcagtct 600
 ccacagctcc tgatctatcg gatgtccaac cttgcctcag gggccctga caggttcagt 660
 ggcagtggat caggcacaga ttttacctg aaaatcagca gagtggaggc tgaggatggt 720
 ggggtttatt actgcatgca acatatagaa tatcctttta cgttcggcca agggaccaa 780
 ctggaaatca aaggaggtgg tggatcgggt ggtggtggtt cgggaggcgg tggatcgag 840
 gtgcagctgg tgcagtctgg acctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 900
 tgcaaggctt ctggatacac cttaccaac tcctggatga actgggtgag gcagaggcct 960
 ggaagggtc ttgagtggat tggacggatt tatcctggag atggagaaac tatctacaat 1020
 gggaaattca gggtcagagt cacgattacc gcggacgaat ccacgagcac agcctacatg 1080
 caactgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag aggctatgat 1140
 gattactcgt ttgcttactg gggccagggg accacgggtca ccgtctcttc aggtggtggt 1200
 ggatccggag gtggtggatc ggggtggtgga ggatcggata ttgtgatgac tcagtctcca 1260
 ctctccctgc ccgtaacccc tggagagccg gcctccatct cctgcaggtc tagtaagagt 1320
 ctctgcata gtaatggcaa cacttacttg tattggttcc tgcagaagcc agggcagtct 1380
 ccacagctcc tgatctatcg gatgtccaac cttgcctcag gggccctga caggttcagt 1440
 ggcagtggat caggcacaga ttttacctg aaaatcagca gagtggaggc tgaggatggt 1500
 ggggtttatt actgcatgca acatatagaa tatcctttta cgttcggcca agggaccaa 1560
 ctggaaatca aa 1572

<210> 13
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 13

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

10

Ala Arg Gly Tyr Asp Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 14
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

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

10 <210> 15
 <211> 1572
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

20 <400> 15

atggactgga cctggagggt cctctttgtg gtggcagcag ctacaggtgt ccagtcccag 60
 gtgcagctgg tgcagtctgg acctgagggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120
 tgcaaggctt ctggatacac cttcaccaac tcttgatga actgggtgag ggagaggcct 180
 ggaaagggtc ttgagtggat tggacggatt tatcctggag atggagaaac tatctacaat 240
 gggaaattca gggtcagagt cacgattacc goggacgaat ccacgagcac agcctacatg 300
 caactgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgagag aggctatgat 360
 gattactogt ttgcttactg gggccaggga accacgggtca ccgtctcttc aggtggtggt 420
 ggatccggag gtggtggatc ggggtggtgga ggatcggata ttgtgatgac tcagtctcca 480
 ctctccctgc ccgtcaccoc tggagagccg gcctccatct cctgcaggtc tagtaagagt 540

ctcctgcata gtaatggcaa cacttacttg tattggttcc tggagaagcc agggcagtct 600
ccacagctcc tgatctatcg gatgtccaac cttgcctcag gggtccttga caggttcagt 660
ggcagtgat caggcacaga ttttactg aaaatcagca gaggggagc tgaggatggt 720
ggggtttatt actgcatgca acatatagaa taccctttta cgttcggcca agggacccaaa 780
ctggaaatca aaggaggtgg tggatcgggt ggtggtggtt cgggagggcg tggatcgcag 840
gtgcagctgg tgcagtctgg acctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 900
tgcaaggctt ctggatacac cttcaccaac tcctggatga actgggtgag gaagaggcct 960
ggaaagggtc ttgagtggat tggacggatt taccctggag atggagaaac tatctacaat 1020
gggaaattca gggtcagagt cacgattacc gcggacgaat ccacgagcac agcctacatg 1080
caactgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgagag aggctatgat 1140
gattactcgt ttgcttactg gggccagggg accacgggtc ccgtctcttc aggtggtggt 1200
ggatccggag gtggtggatc ggggtggtgga ggatcggata ttgtgatgac tcagtctcca 1260
ctctccctgc ccgtcaccoc tggagagccg gcctccatct cctgcaggtc tagtaagagt 1320
ctcctgcata gtaatggcaa cacttacttg tattggttcc tgaagaagcc agggcagtct 1380
ccacagctcc tgatctatcg gatgtccaac cttgcctcag gggtccttga caggttcagt 1440
ggcagtgat caggcacaga ttttactg aaaatcagca gaggggagc tgaggatggt 1500
ggggtttatt actgcatgca acatatagaa taccctttta cgttcggcca agggacccaaa 1560
ctggaaatca aa 1572

<210> 16
<211> 524
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 16

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

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Asp Asp Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro
 145 150 155 160
 Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg
 165 170 175
 Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp
 180 185 190
 Phe Leu Glu Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met
 195 200 205
 Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 210 215 220
 Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val
 225 230 235 240
 Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Ile Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly
 245 250 255
 Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 260 265 270
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro
 275 280 285
 Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 290 295 300
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Lys Arg Pro
 305 310 315 320
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu
 325 330 335
 Thr Ile Tyr Asn Gly Lys Phe Arg Val Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
 340 345 350
 Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
 355 360 365
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Asp Asp Tyr Ser Phe
 370 375 380
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 385 390 395 400
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met
 405 410 415
 Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser
 420 425 430

ES 2 592 271 T3

Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr
 435 440 445
 Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Lys Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu
 450 455 460
 Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 465 470 475 480
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu
 485 490 495
 Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Ile Glu Tyr Pro
 500 505 510
 Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 515 520

<210> 17
 <211> 1572
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 17

atggactgga cctggaggtt cctctttgtg gtggcagcag ctacaggtgt ccagtcccag 60
 gtgcagctgg tgcagctctgg acctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 120
 tgcaaggctt ctggatacac cttcaccaac tctctggatga actgggtgag ggagaggcct 180
 ggaaagggtc ttgagtggat tggacggatt tctctggag atggagaaac tatctacaat 240
 gggaaattca gggtcagagt cacgattacc gcggacgaat ccacgagcac agcctacatg 300
 caactgagca gcctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag aggctatgat 360
 gattactcgt ttgcttactg gggccagggg accacgggtca cgtctcttc aggtggtggt 420
 ggatccggag gtggtggatc ggggtggtgga ggatcggata ttgtgatgac tcagtctcca 480
 ctctccctgc ccgtcacccc tggagagccg gcctccatct cctgcaggtc tagtaagagt 540
 ctctgcata gtaatggcaa cacttacttg tattggttcc tgaagaagcc agggcagctc 600
 ccacagctcc tgatctatcg gatgtccaac cttgcctcag gggtcctga caggttcagt 660
 ggcagtgat caggcacaga ttttacctg aaatcagca gaggagggc tgaggatggt 720
 ggggtttatt actgcatgca acatatagaa tctctttta cgttcggcca agggacccaa 780
 ctggaatca aaggaggtgg tggatcgggt ggtggtggtt cgggaggcgg tggatcgcag 840
 gtgcagctgg tgcagctctgg acctgaggtg aagaagcctg gggcctcagt gaaggtctcc 900
 tgcaaggctt ctggatacac cttcaccaac tctctggatga actgggtgag gaagaggcct 960
 ggaaagggtc ttgagtggat tggacggatt tctctggag atggagaaac tatctacaat 1020

gggaaattca gggtcagagt cacgattacc goggacgaat ccacgagcac agcctacatg 1080
 caactgagca goctgagatc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgagag aggctatgat 1140
 gattactcgt ttgcttactg gggccaggga accacgggtca ccgtctcttc aggtggtggt 1200
 ggatccggag gtggtggatc gggtggtgga ggatcggata ttgtgatgac tcagtctcca 1260
 ctctccctgc ccgtcacccc tggagagccg gcoctccatct cctgcaggtc tagtaagagt 1320
 ctctctgcata gtaatggcaa cacttacttg tattggttcc tggagaagcc agggcagtct 1380
 ccacagctcc tgatctatcg gatgtccaac cttgcctcag gggccctga caggttcagt 1440
 ggcagtgat caggcacaga ttttacctg aaaatcagca gagtggagc tgaggatggt 1500
 ggggtttatt actgcatgca acatatagaa taccctttta cgttcggcca agggaccaa 1560
 ctggaaatca aa 1572

<210> 18
 <211> 524
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 18

Met	Asp	Trp	Thr	Trp	Arg	Phe	Leu	Phe	Val	Val	Ala	Ala	Ala	Thr	Gly
1				5					10					15	
Val	Gln	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Val	Lys	Lys
			20					25					30		
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe
		35					40					45			
Thr	Asn	Ser	Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Glu	Arg	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Glu	Thr	Ile	Tyr	Asn
65					70					75					80
Gly	Lys	Phe	Arg	Val	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser
				85					90					95	
Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Tyr	Asp	Asp	Tyr	Ser	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly
		115					120					125			
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
	130					135						140			
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro
145					150					155					160
Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg
				165					170					175	

Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp
180 185 190

Phe Leu Lys Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met
195 200 205

Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
210 215 220

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val
225 230 235 240

Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Ile Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly
245 250 255

Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
260 265 270

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro
275 280 285

Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
290 295 300

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Lys Arg Pro
305 310 315 320

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu
325 330 335

Thr Ile Tyr Asn Gly Lys Phe Arg Val Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp
340 345 350

Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu
355 360 365

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Asp Asp Tyr Ser Phe
370 375 380

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
385 390 395 400

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met
405 410 415

Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser
420 425 430

Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr
435 440 445

Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Glu Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu
450 455 460

Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
465 470 475 480

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu
485 490 495

Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Ile Glu Tyr Pro
500 505 510

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 515 520

<210> 19
 <211> 411
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 19

atgggactgga cctggagaat cctctttttg gtggcagcag ccaaaggtgc ccaactccgag 60
 gtccagcttg tgcagtctgg ggctgaggtg gtgaagcctg ggtcctcagt gaaggtttcc 120
 tgcacggcct ctggatacac cttcagtgac tactatatgc actgggtgcy ccaggcoccc 180
 ggagaagggc ttgagtggat gggatacatt aatcctagca gtggttatac taagtacaat 240
 cggaagttca gggacagagt caccattacc gcggacaaat ccacgagcac agcctacatg 300
 gagctgagca gcctgagatc tgaagacacg gctgtgtatt actgtgcygag agggggctctc 360
 ggttactacc ttgactactg gggcgagggc accacggtca cegtctcctc a 411

<210> 20
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 20

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

<210> 21
 <211> 414
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

atggactgga cctggagcat ccttttcttg gtggcagcag caacaggtgc ccaactccgag 60
 gtgcagctgg tgcagtctgg agctcaggtg aagaagccgg gggcctcagt gaaggtctcc 120
 tgcaaggcct ctggctacac gttttccgac aacaacatgg actgggtgcg acaggccoct 180
 ggaaaagggc ttgagtggat gggagatatt aatactaaaa gtggtgggttc tatctacaac 240
 cagaagttca agggcagagt catcatgacc atagacaaat ccacggggcac agcctacatg 300
 gaattgagga gcctgagatc agacgacacg gccatatatt actgtgogag gaggaggagc 360
 tacggctact actttgacta ctggggccgg ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 414

5 <210> 22
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 22

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

15 <210> 23
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 23

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tactctggct ccgaggtgcc 60
 agatgtgaca tcgtgatgac ccagctctcca tectccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
 gtcaccatca cttgcaaggc cagtcagaat gtggggactg ctgtagcctg gtatcagcag 180

ES 2 592 271 T3

aaaccagga aagcccctaa gctcctgac tattcgcat cctaccgggc cagtggggtc 240
 ccatcaaggt tcagtgccag tcgatatggg acagatttca ctctcaccat ctcaagcttg 300
 caacctgaag atttagcaac ttactactgt cagcaatata gcaactatat cacgttcggc 360
 caagggacca aggtggagat caaa 384

<210> 24
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 24

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

10

<210> 25
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 25

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

15

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

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 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> 26
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 26

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

5

10

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
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 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
 Asp 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> 27
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 27

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

5

10

			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			
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		
			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	Lys	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> 28
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
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
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
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 Glu 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> 29
<211> 327
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 29

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser 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
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
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 Lys 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

10

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> 30
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 30

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

10

```

                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 Glu Ser
305                310                315                320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
                325

```

<210> 31
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 31

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1                5                10                15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
                20                25                30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
                35                40                45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50                55                60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser 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
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180                185                190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195                200                205

```

10

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 Lys 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> 32
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 32

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

10

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

Asp 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> 33
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 33

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

10

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				
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp			
			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	Lys	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	Lys	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> 34
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 34

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	

10

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
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 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
 Asp 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 Glu Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 35
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 35

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

5

10

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
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 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 Lys 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 Lys 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> 36
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 36

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

5

10

			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			
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		
			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	Glu	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	Glu	Ser		
305					310					315					320		
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys											
				325													

<210> 37
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 37

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

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
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 Lys Lys 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> 38
 <211> 327
 <212> PRT
 5 <213> *Homo sapiens*

<400> 38

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

Asp 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> 39
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 39

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

10

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Glu 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> 41
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 41

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

10

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 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 Cys Gln Glu Lys 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> 42
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 42

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

10

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		
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
			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	Cys	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	Glu	Ser	
305					310					315					320	
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys										
				325												

<210> 43
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 43

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		

10

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

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 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 Cys Gln Lys 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> 44
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 44

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

5

10

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
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 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 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Glu 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 Glu Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 45
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 45

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

5

10

			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			
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		
			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	Cys	Gln	Lys	Lys	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> 46
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 46

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

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 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 Cys Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Glu 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 Glu Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 47
<211> 327
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 47

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
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
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 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Gln Lys Lys 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

10

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> 48
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 48

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
 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

10

				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> 49
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 49

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
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			

10

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 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp 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> 50
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 50

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

10

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 Cys Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala 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 Val 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> 51
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 51

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

10

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	Glu	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	Asp	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> 52
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 52

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		

10

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 Lys
 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 Lys 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> 53
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 53

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

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
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Asp 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 54
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 54

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

5

10

<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 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 Glu 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 56
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 56

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
 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 Lys Lys
 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

10

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

5 <210> 57
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 57

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

10 <210> 58
 <211> 120
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*

<400> 58

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

Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 59
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 59

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

10

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de uno de los isómeros conformacionales de un anticuerpo sc(Fv)₂ que comprende una sustitución en un resto de aminoácido de la superficie de contacto del anticuerpo sc(Fv)₂, que está formado por la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo, de modo que la asociación del polipéptido en el anticuerpo sc(Fv)₂ se regulará para obtener de manera eficaz uno de los isómeros conformacionales de un anticuerpo sc(Fv)₂, comprendiendo el método las etapas de:
- (a) modificar un ácido nucleico, que codifica un resto de aminoácido que forma la superficie de contacto del polipéptido del ácido nucleico original, de modo que se inhiba la asociación del polipéptido que forma uno de los isómeros conformacionales en un anticuerpo sc(Fv)₂ que puede formar dos tipos de isómeros conformacionales;
- (b) cultivar células hospedadoras de modo que se exprese una secuencia de ácido nucleico modificada mediante la etapa (a); y
- (c) recuperar del cultivo de células hospedadoras dicho isómero conformacional de dicho anticuerpo sc(Fv)₂, en el que la modificación de la etapa (a) consiste en modificar el ácido nucleico original de manera que se sustituyan uno o más restos de aminoácidos en la superficie de contacto de modo que dos o más restos de aminoácidos, incluyendo el/los resto/s mutado/s, que forman la superficie de contacto, porten el mismo tipo de carga positiva o negativa.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho uno o más restos de aminoácido se sustituyen con:
- (a) ácido glutámico (E);
- (b) ácido aspártico (D);
- (c) lisina (K);
- (d) arginina (R); o
- (e) histidina (H).
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que los restos de aminoácido que se sustituirán en la superficie de contacto son los restos de aminoácido de los siguientes (1) y (2) o de los siguientes (3) y (4):
- (1) el resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena pesada, en la posición H39 de acuerdo con la numeración de Kabat;
- (2) el resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena ligera, en la posición L38 de acuerdo con la numeración de Kabat;
- (3) el resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena pesada, en la posición H45 de acuerdo con la numeración de Kabat; y
- (4) el resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena ligera, en la posición L44 de acuerdo con la numeración de Kabat.
4. El método de la reivindicación 3, en el que
- (1) el resto de aminoácido de la región variable de cadena pesada, de la posición H39 de acuerdo con la numeración de Kabat, es glutamina (Q);
- (2) el resto de aminoácido de la región variable de cadena ligera, de la posición L38 de acuerdo con la numeración de Kabat, es glutamina (Q);
- (3) el resto de aminoácido de la región variable de cadena pesada, de la posición H45 de acuerdo con la numeración de Kabat, es leucina (L); y
- (4) el resto de aminoácido de la región variable de cadena ligera, de la posición L44 de acuerdo con la numeración de Kabat, es prolina (P).
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo sc(Fv)₂ es un polipéptido monocatenario en el que dos regiones variables de cadena pesada y dos regiones variables de cadena ligera están unidas por enlazadores.
6. El método de la reivindicación 5, en el que la longitud de los enlazadores que unen las regiones variables del anticuerpo sc(Fv)₂ es de 15 aminoácidos.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo sc(Fv)₂ es un anticuerpo humanizado.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el isómero conformacional de un anticuerpo sc(Fv)₂ es de tipo diacuerpo monocatenario o de tipo scFv bivalente.
9. Un método de regulación de la asociación de un anticuerpo sc(Fv)₂ que comprende modificar un resto de aminoácido de la superficie de contacto del anticuerpo sc(Fv)₂, que está formado por la región variable de cadena

- pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo, de modo que se inhiba la asociación del anticuerpo sc(Fv)₂ que forma uno de los isómeros conformacionales, en el que dicha modificación es la sustitución de uno o más restos de aminoácido en la superficie de contacto en la que dos o más restos de aminoácidos, incluyendo el/los resto/s de aminoácido sustituido/s, que forman la superficie de contacto tendrán el mismo tipo de carga positiva o negativa.
- 5
10. El método de la reivindicación 9, en el que dicho uno o más restos de aminoácido están sustituidos con:
- 10 (a) ácido glutámico (E);
(b) ácido aspártico (D);
(c) lisina (K);
(d) arginina (R); o
(e) histidina (H).
- 15 11. El método de la reivindicación 9 o de la reivindicación 10, en el que los restos de aminoácido que se sustituirán en la superficie de contacto son los restos de aminoácido de los siguientes (1) y (2) o los siguientes (3) y (4):
- 20 (1) el resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena pesada, en la posición H39 de acuerdo con la numeración de Kabat;
(2) el resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena ligera, en la posición L38 de acuerdo con la numeración de Kabat;
(3) el resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena pesada, en la posición H45 de acuerdo con la numeración de Kabat; y
25 (4) el resto de aminoácido que está incluido en la región variable de cadena ligera, en la posición L44 de acuerdo con la numeración de Kabat.
12. El método de la reivindicación 11, en el que:
- 30 (1) el resto de aminoácido de la región variable de cadena pesada, de la posición H39 de acuerdo con la numeración de Kabat, es glutamina (Q);
(2) el resto de aminoácido de la región variable de cadena ligera, de la posición L38 de acuerdo con la numeración de Kabat, es glutamina (Q);
(3) el resto de aminoácido de la región variable de cadena pesada, de la posición H45 de acuerdo con la numeración de Kabat, es leucina (L); y
35 (4) el resto de aminoácido de la región variable de cadena ligera, de la posición L44 de acuerdo con la numeración de Kabat, es prolina (P).
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que el anticuerpo sc(Fv)₂ es un polipéptido monocatenario en el que dos regiones variables de cadena pesada y dos regiones variables de cadena ligera están unidas por enlazadores.
- 40
14. El método de la reivindicación 13, en el que la longitud de los enlazadores que unen las regiones variables del anticuerpo sc(Fv)₂ es de 15 aminoácidos.
- 45 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en el que el anticuerpo sc(Fv)₂ es anticuerpo humanizado.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en el que el isómero conformacional de un anticuerpo sc(Fv)₂ es de tipo diacuerpo monocatenario o de tipo scFv bivalente.
- 50 17. Un isómero conformacional de un anticuerpo sc(Fv)₂ que se puede obtener mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
18. Una composición farmacéutica que comprende un isómero conformacional de un anticuerpo sc(Fv)₂ que se puede obtener mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 55

FIG. 1

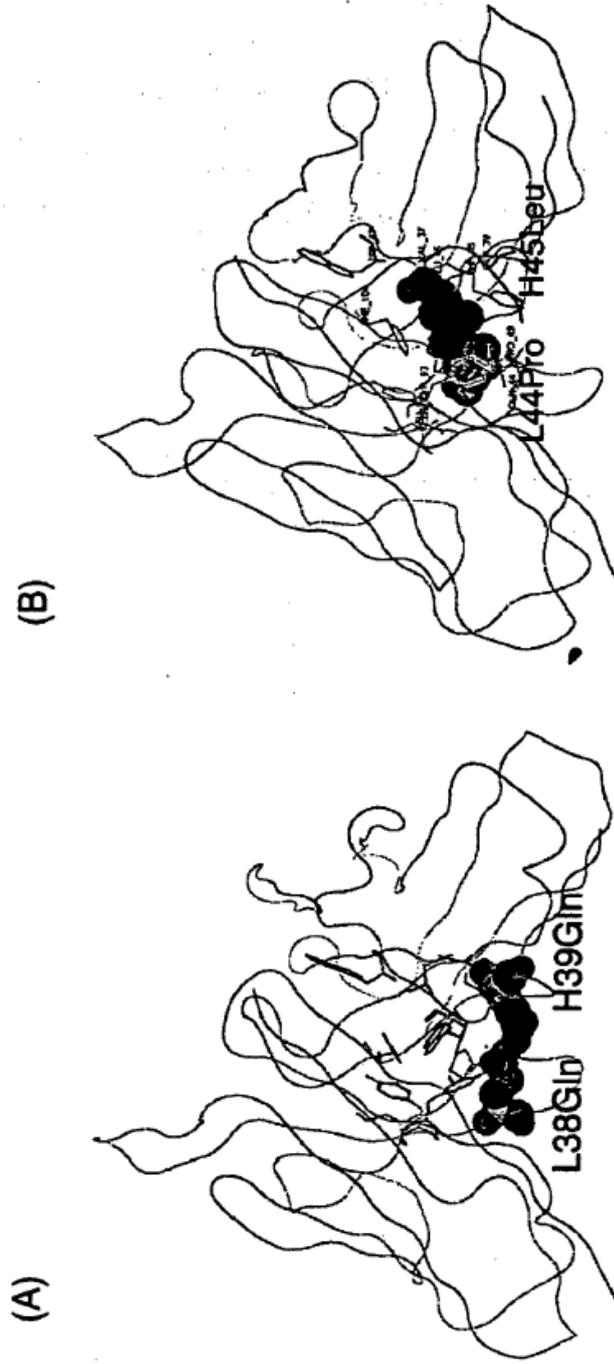


FIG. 2

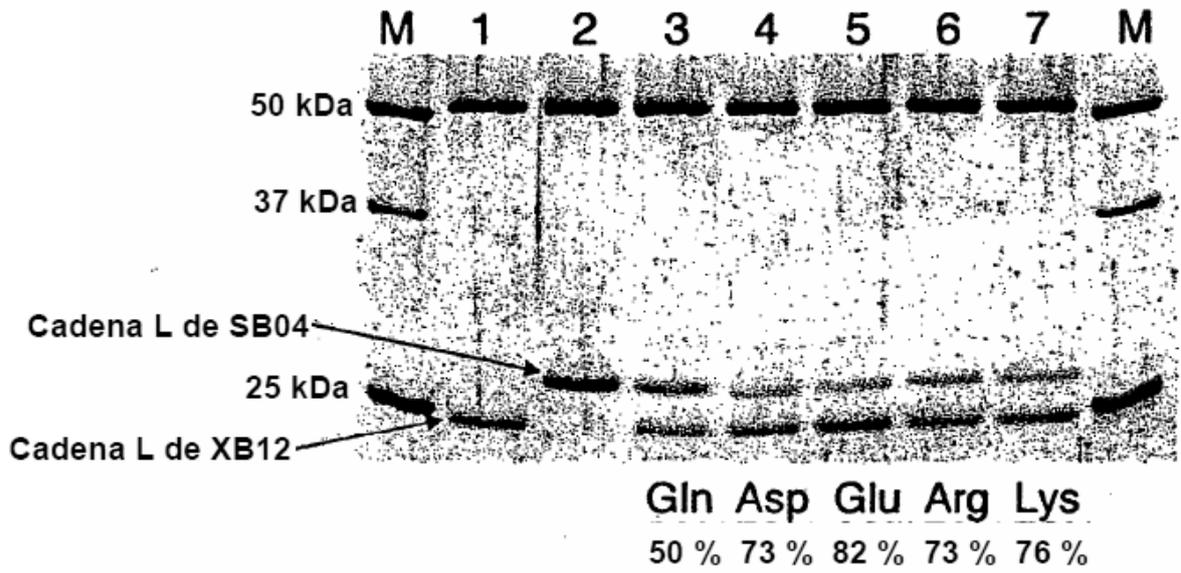


FIG. 3

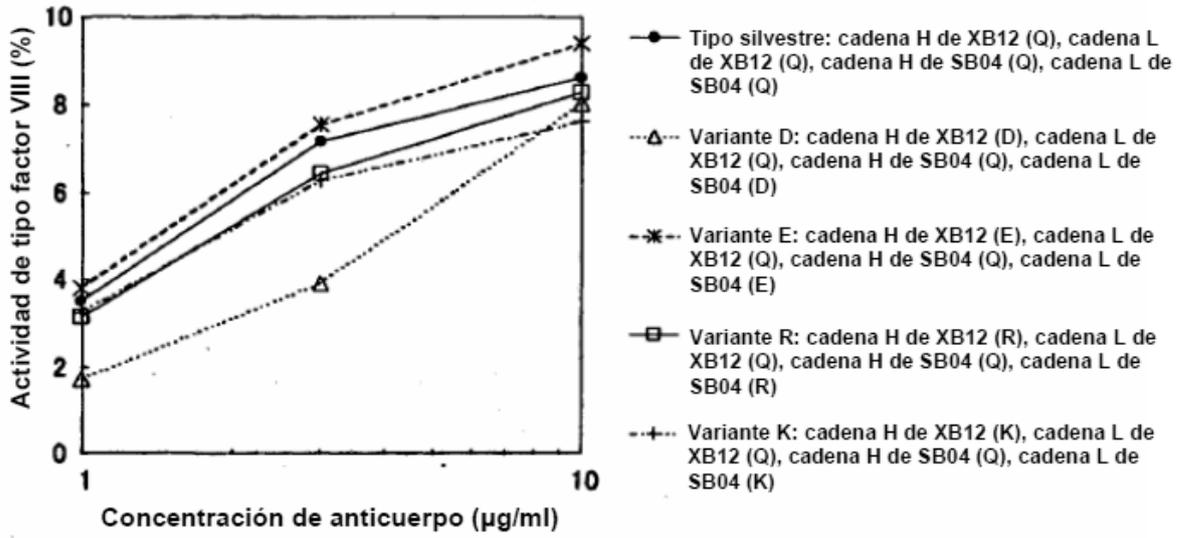


FIG. 4

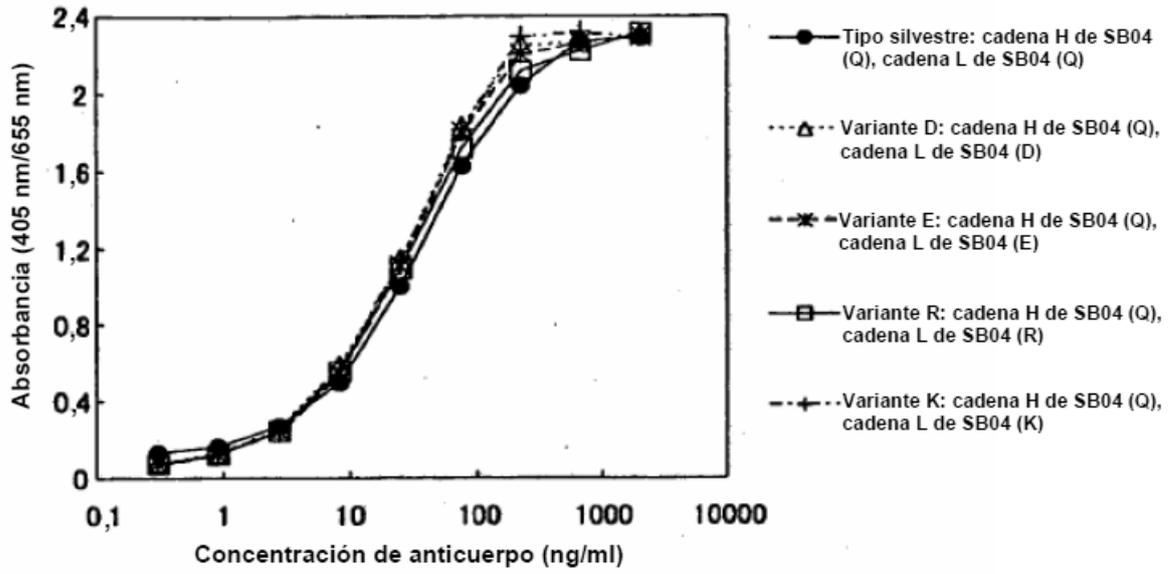


FIG. 5

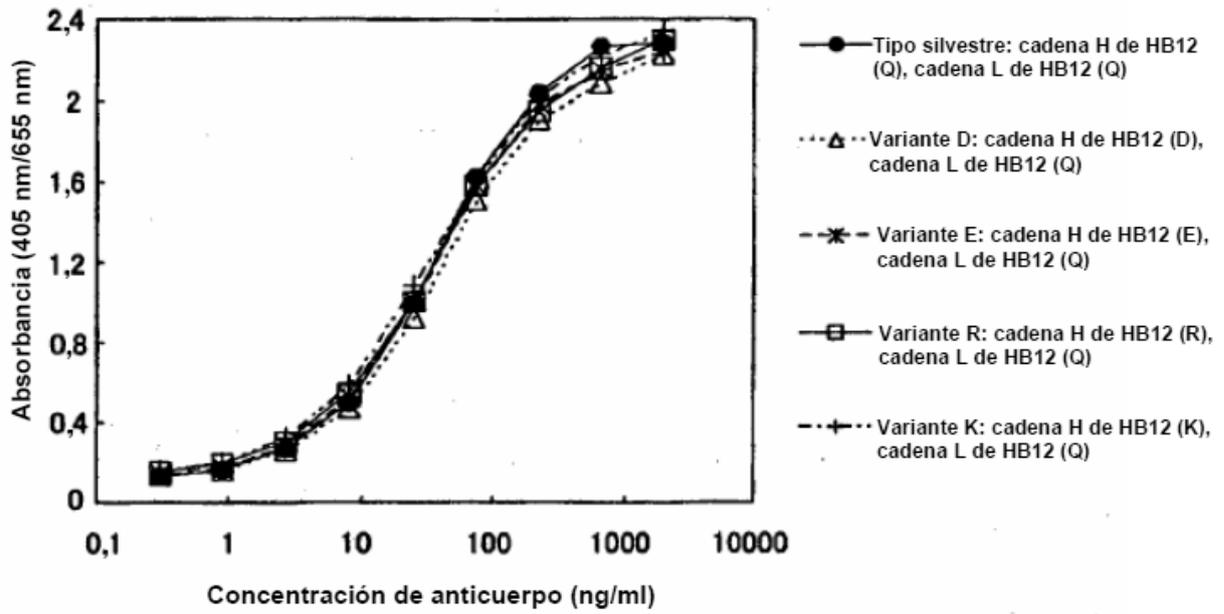


FIG. 6

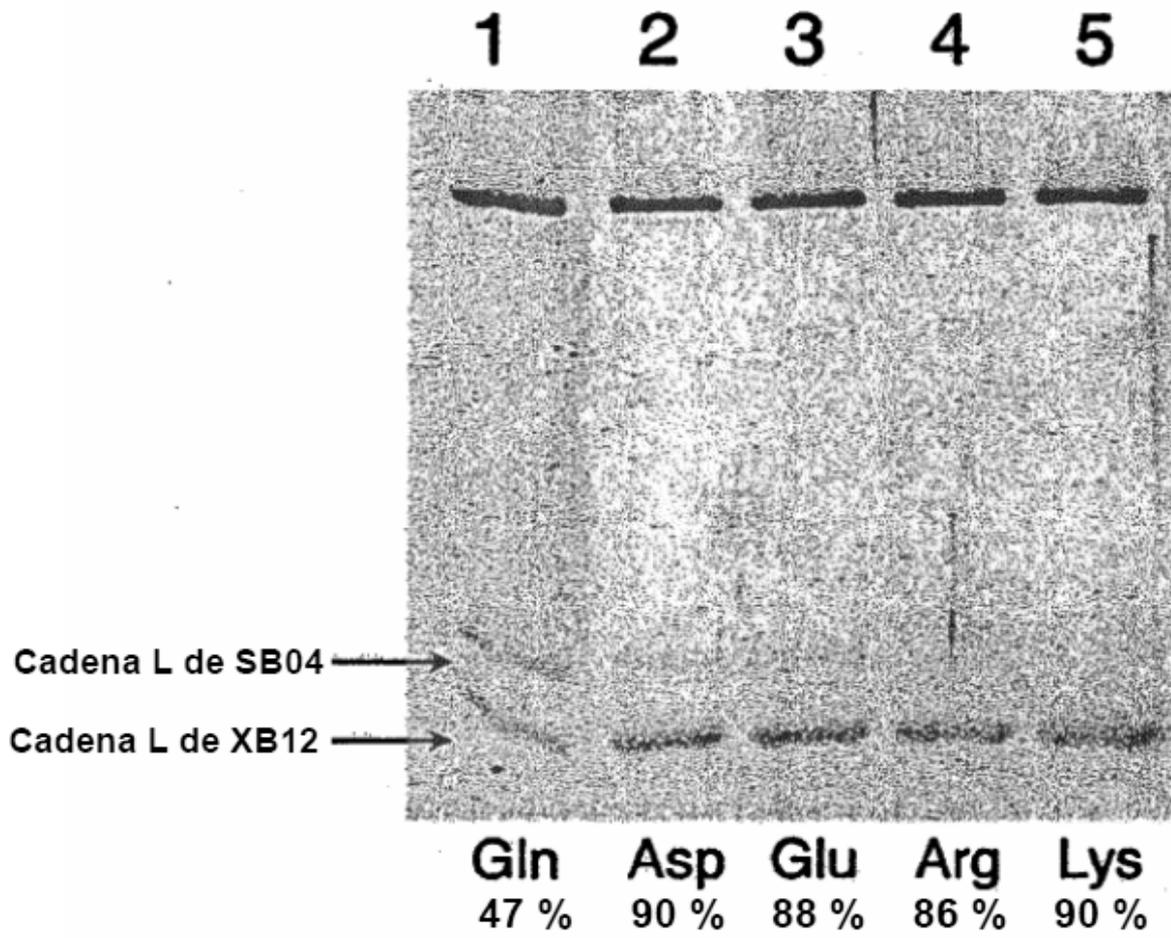


FIG. 7

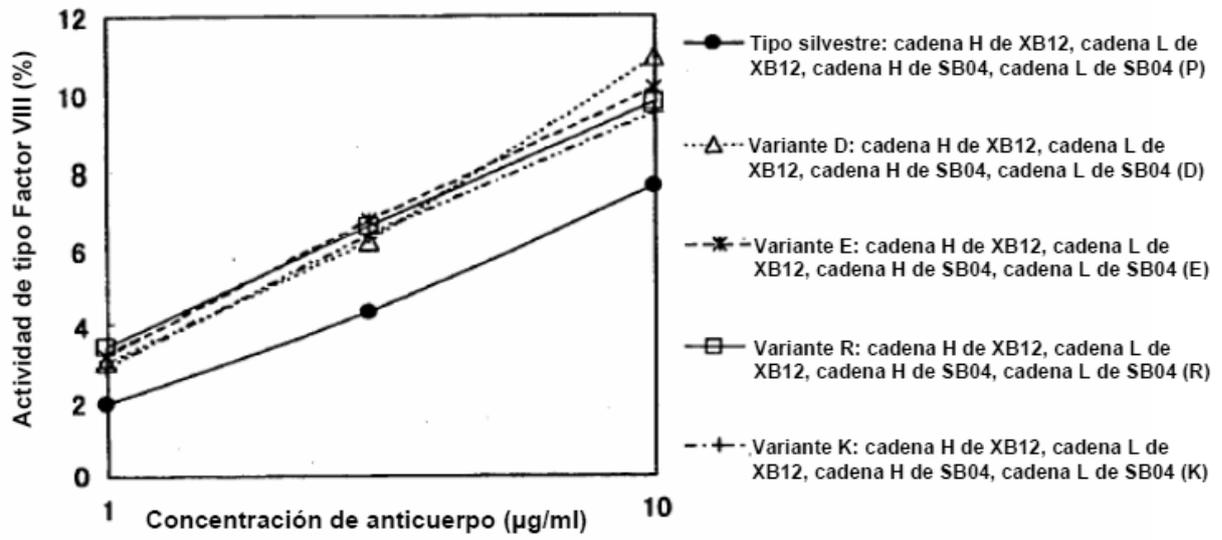


FIG. 8

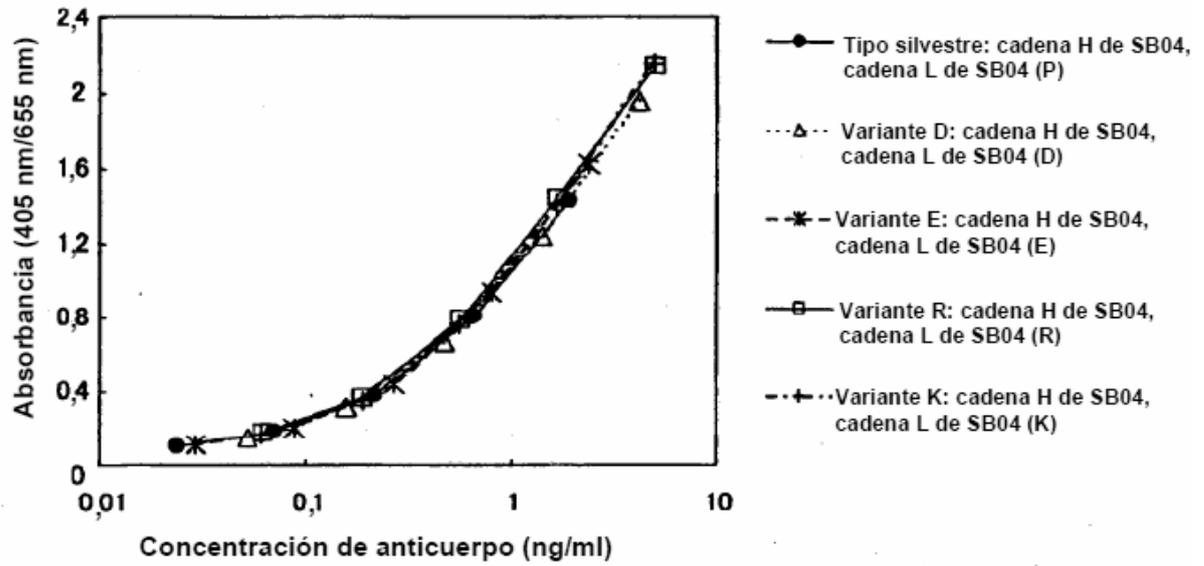


FIG.9

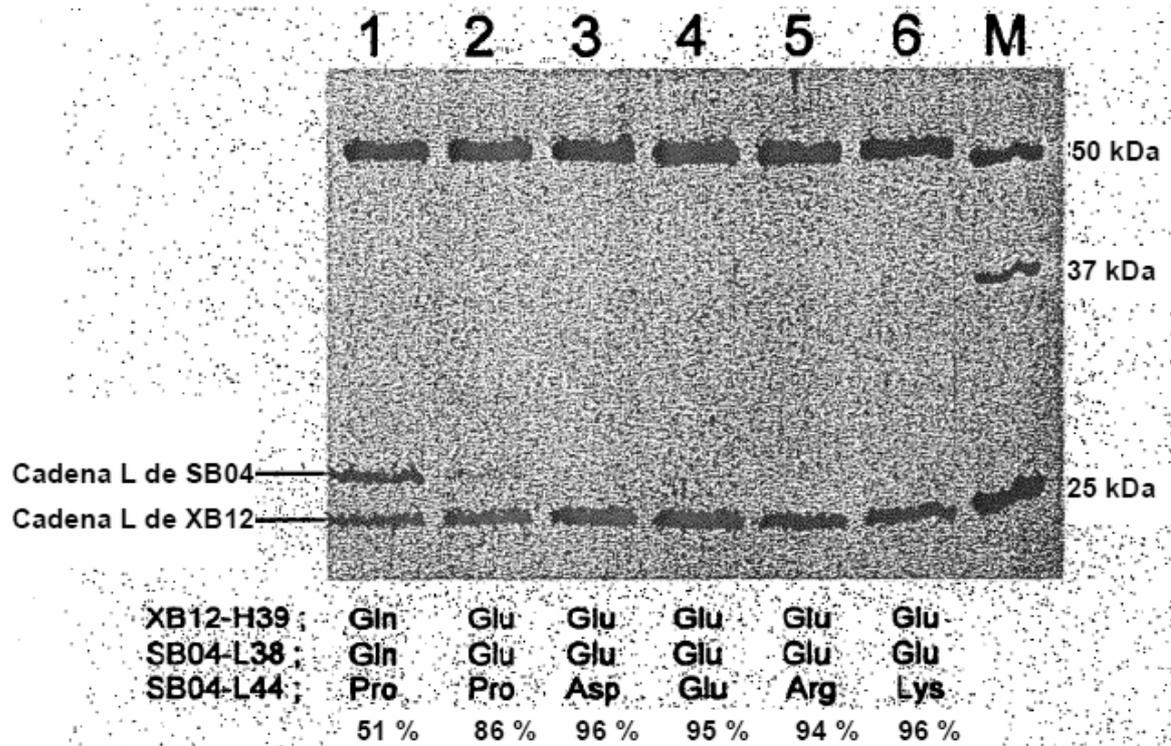


FIG. 10

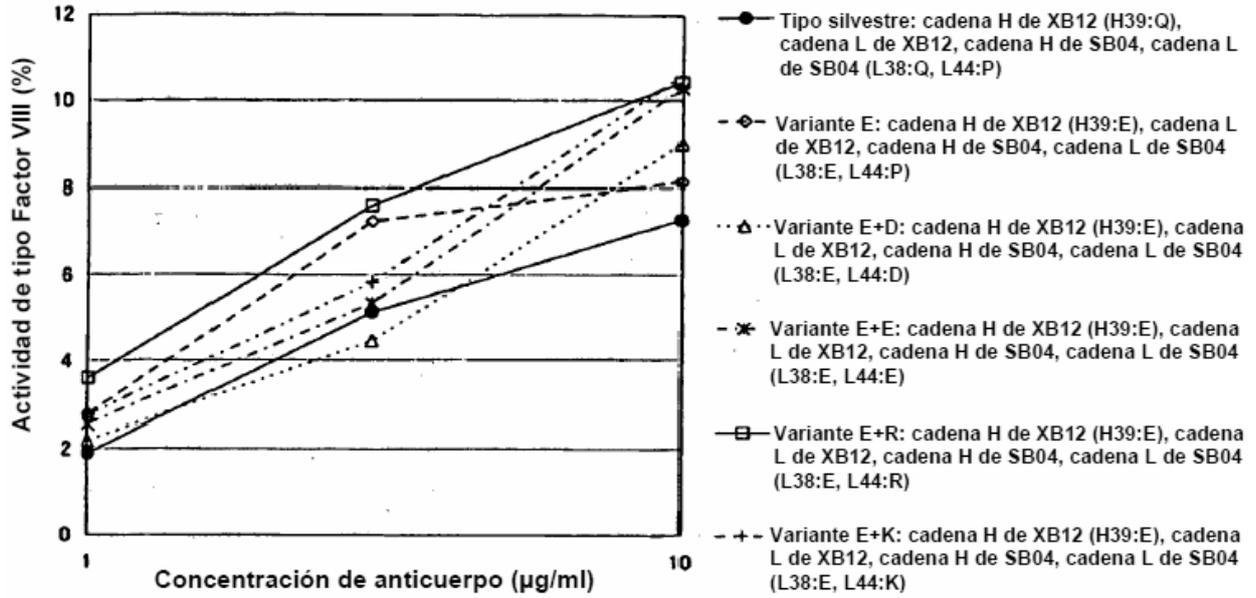


FIG. 11

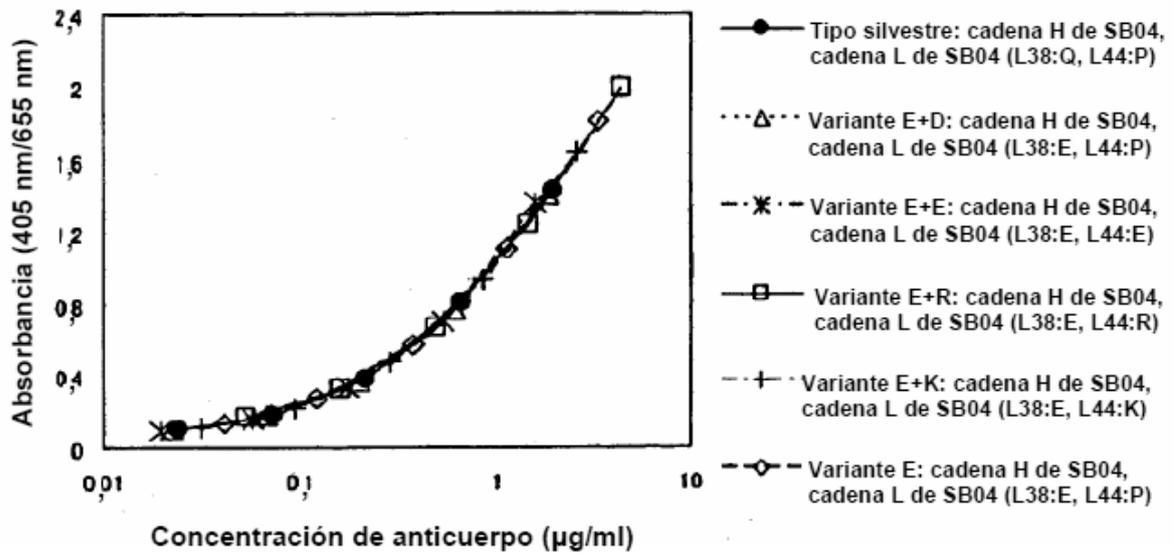


FIG. 12

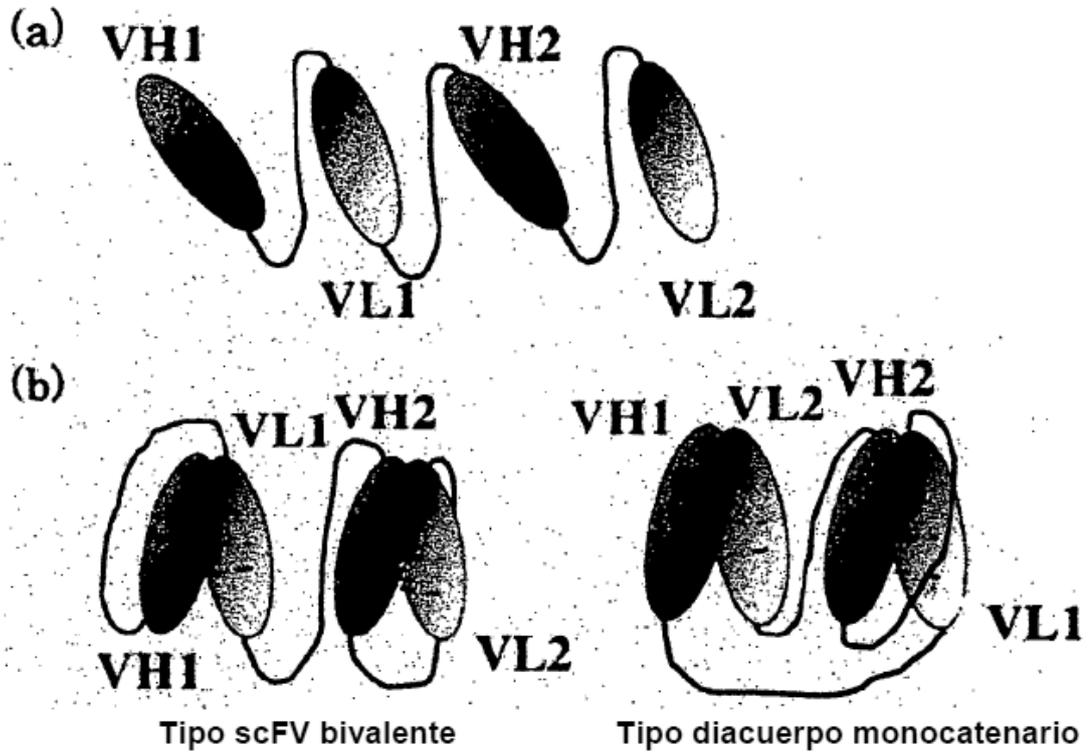


FIG. 13

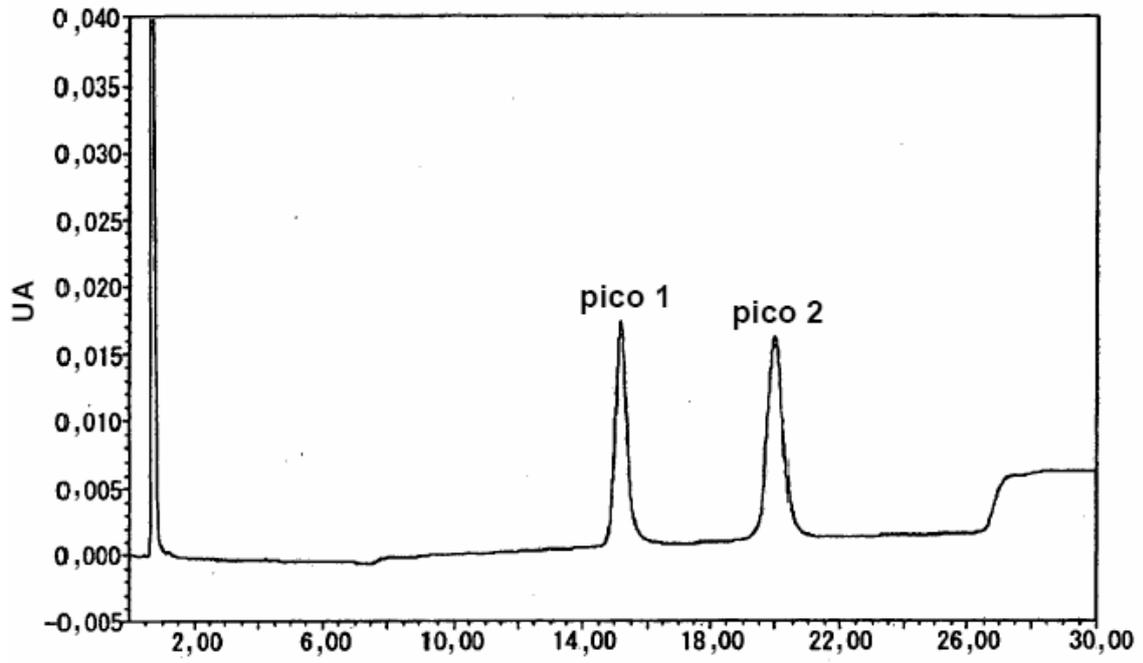


FIG. 14

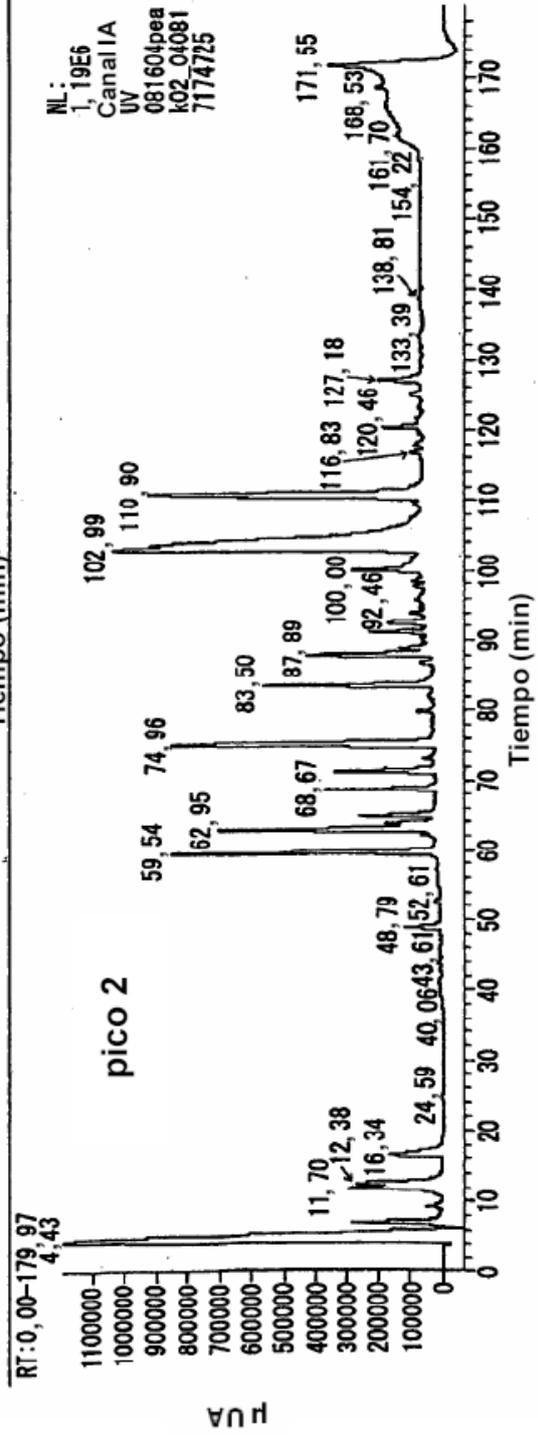
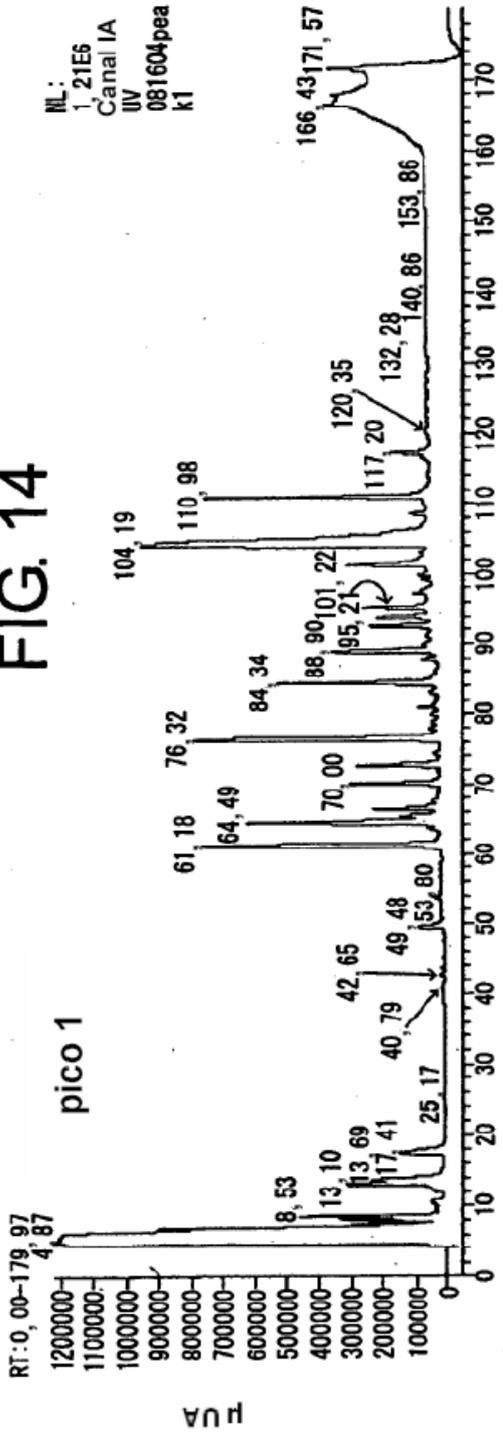


FIG. 15

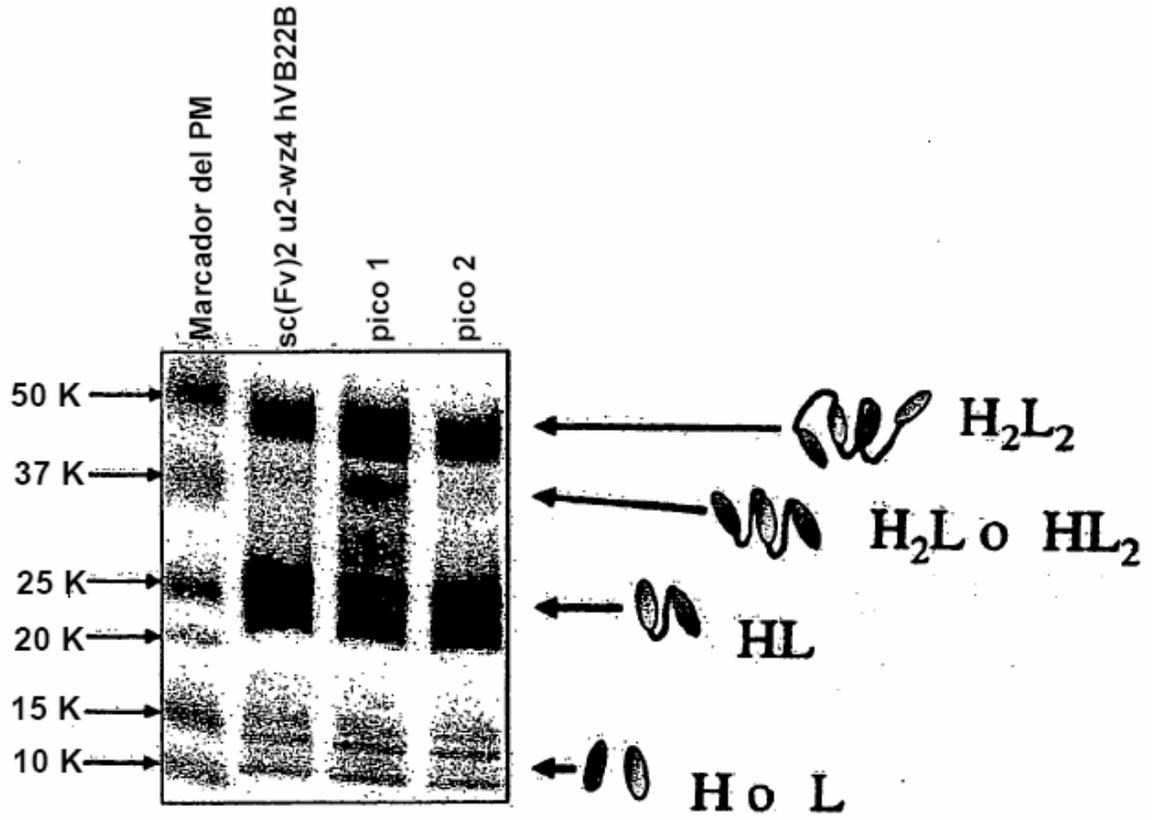


FIG. 16

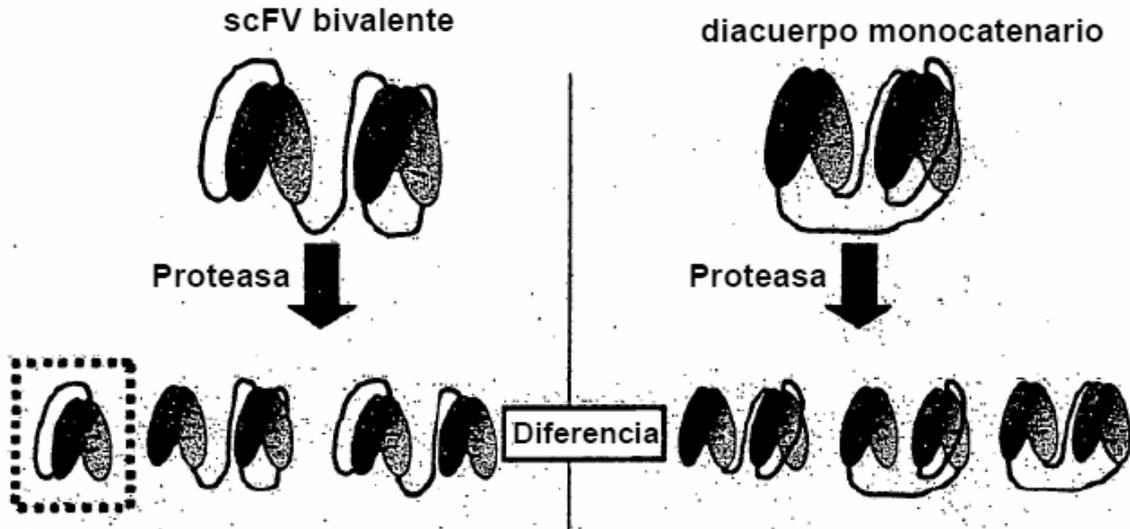


FIG. 17

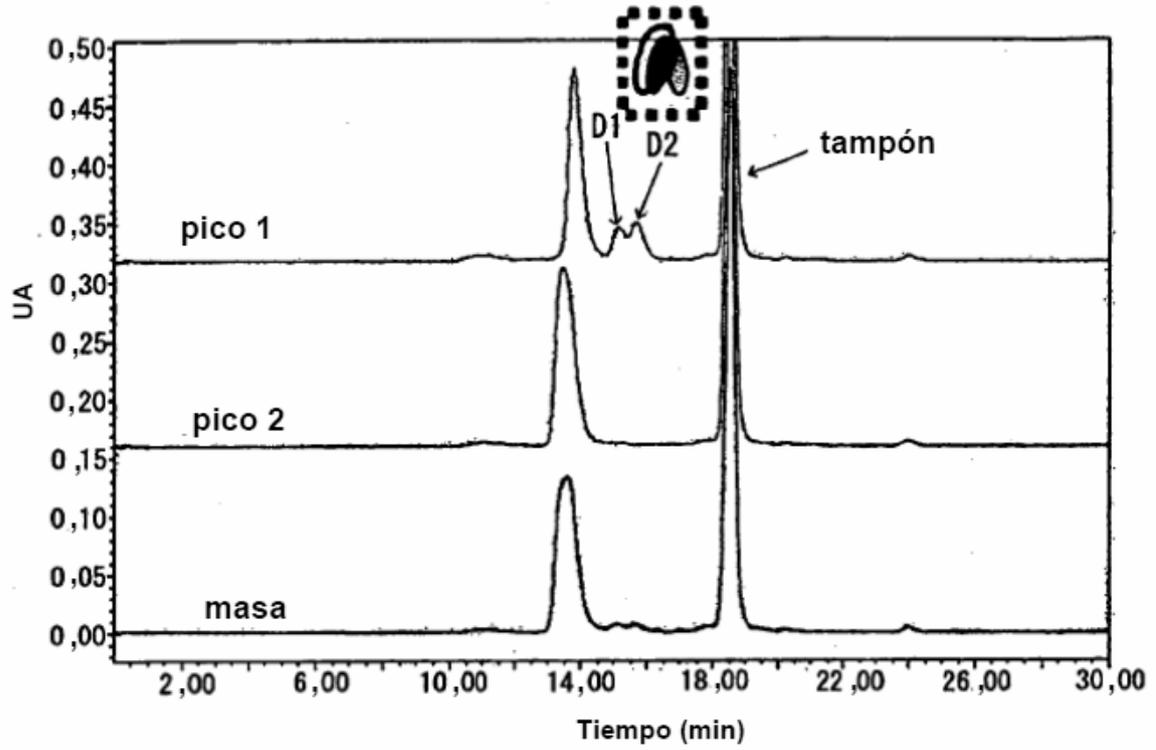


FIG. 18

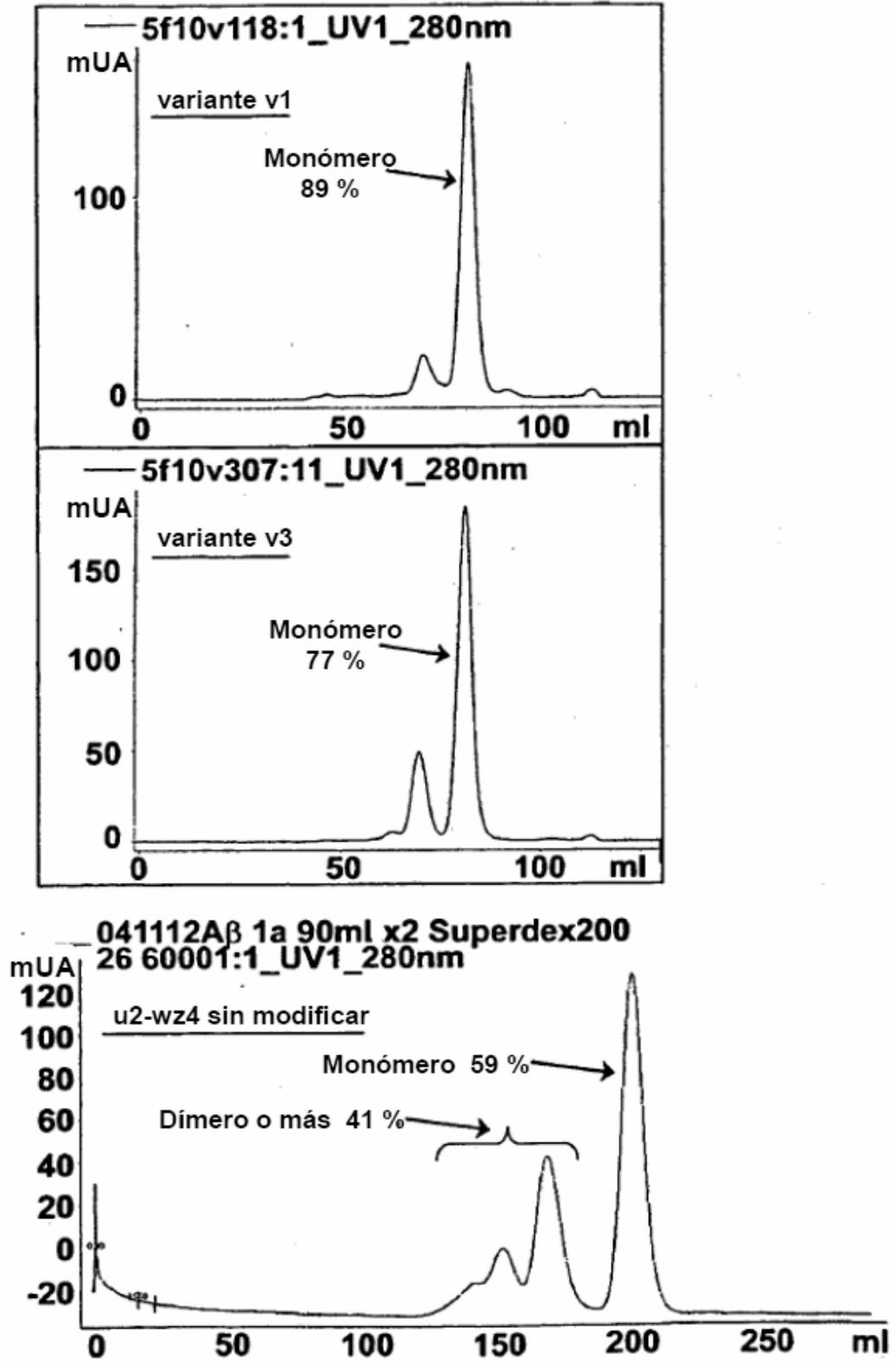


FIG. 19

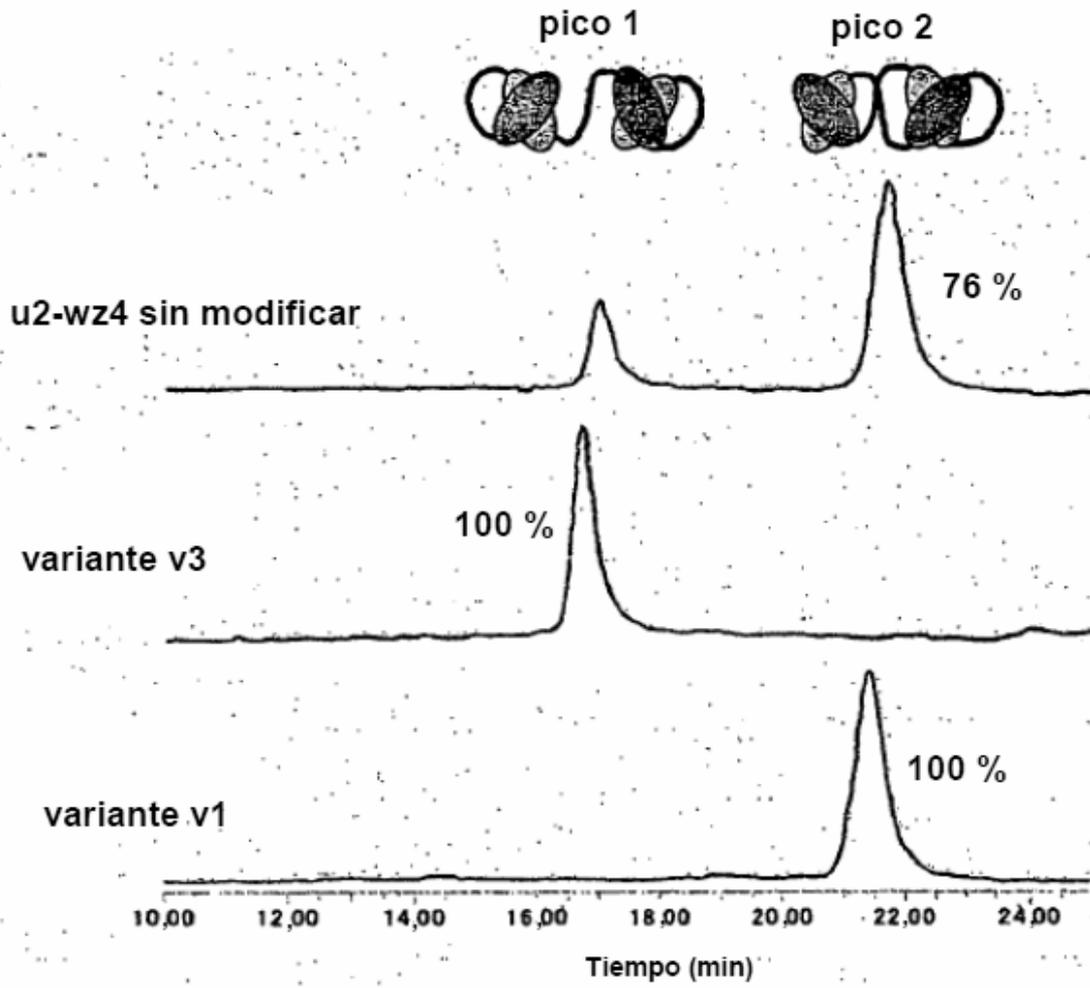


FIG. 20

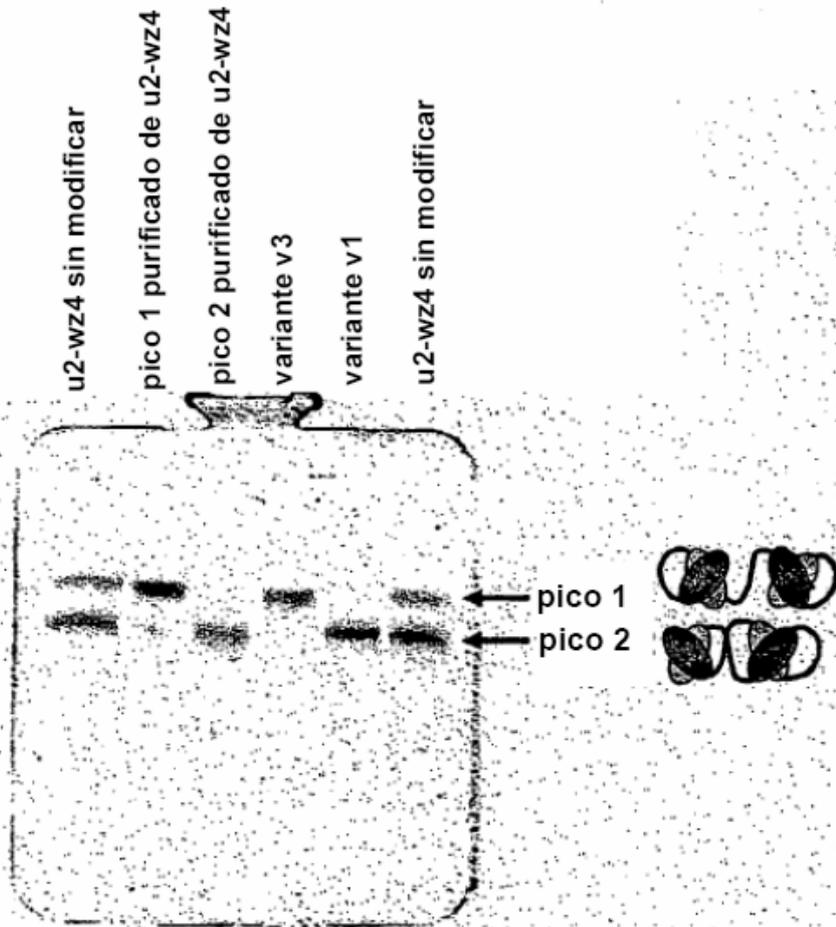


FIG. 21

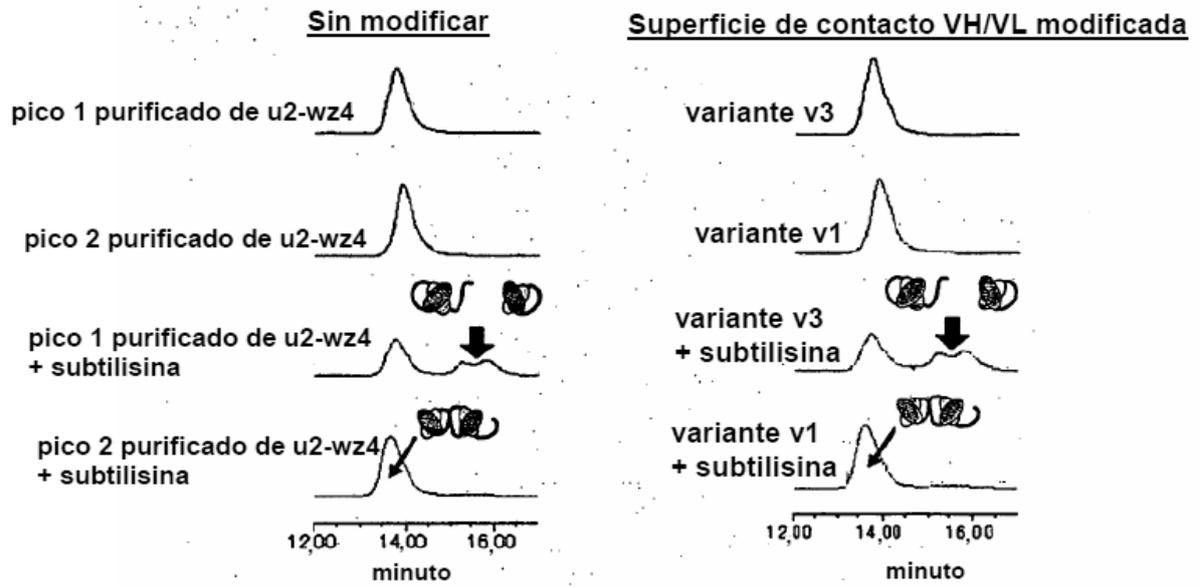


FIG. 22

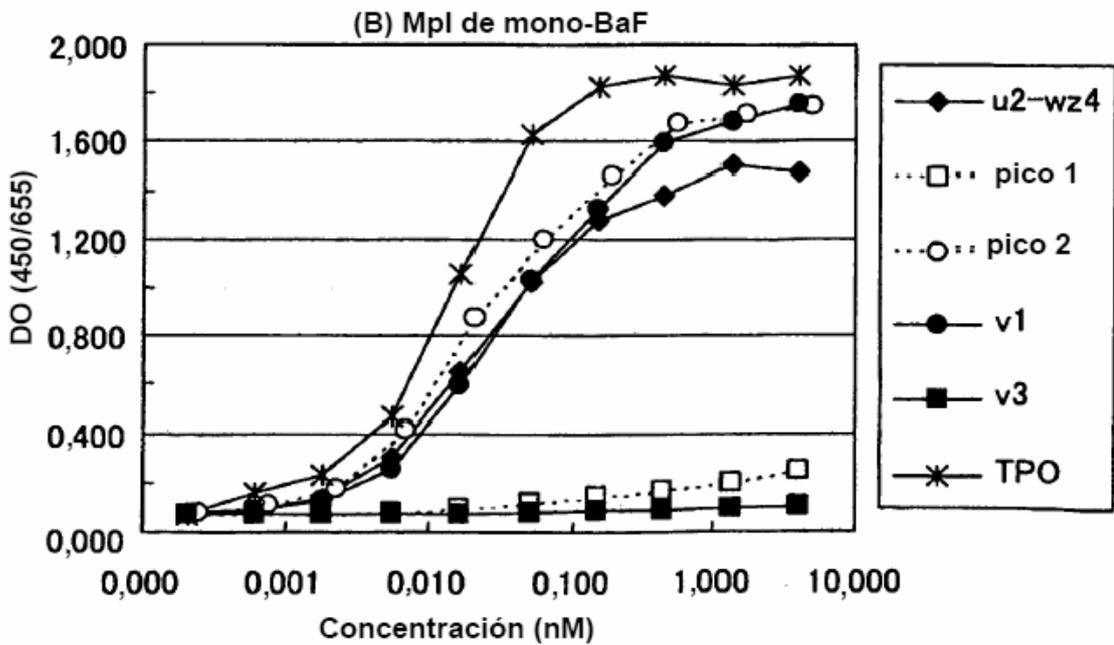
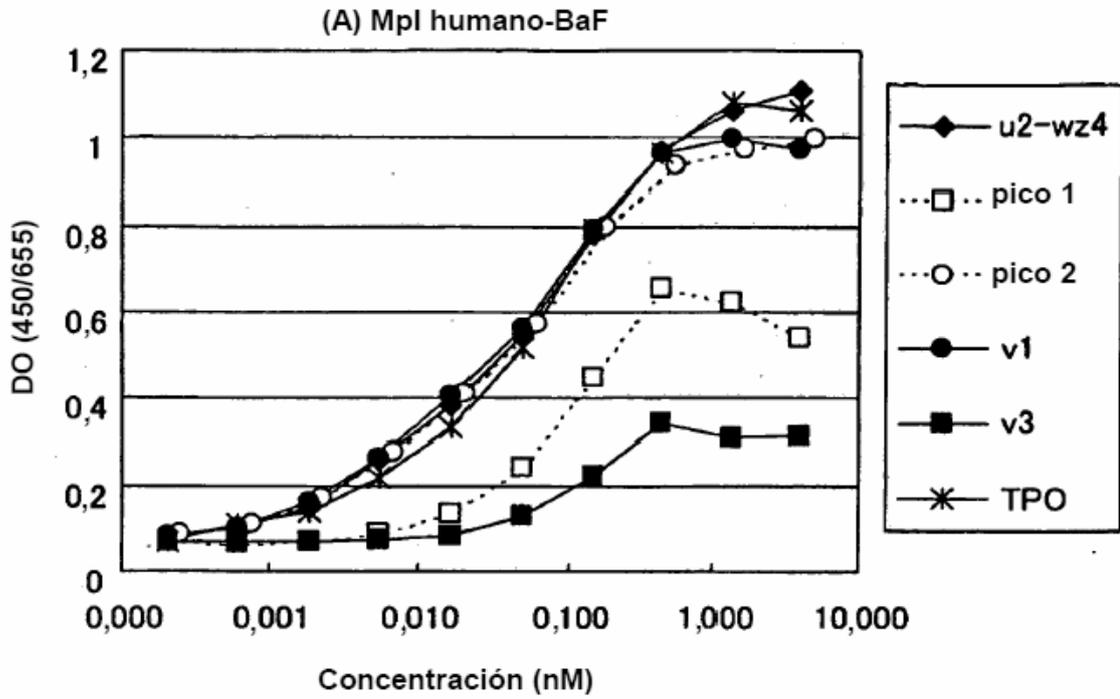


FIG. 23

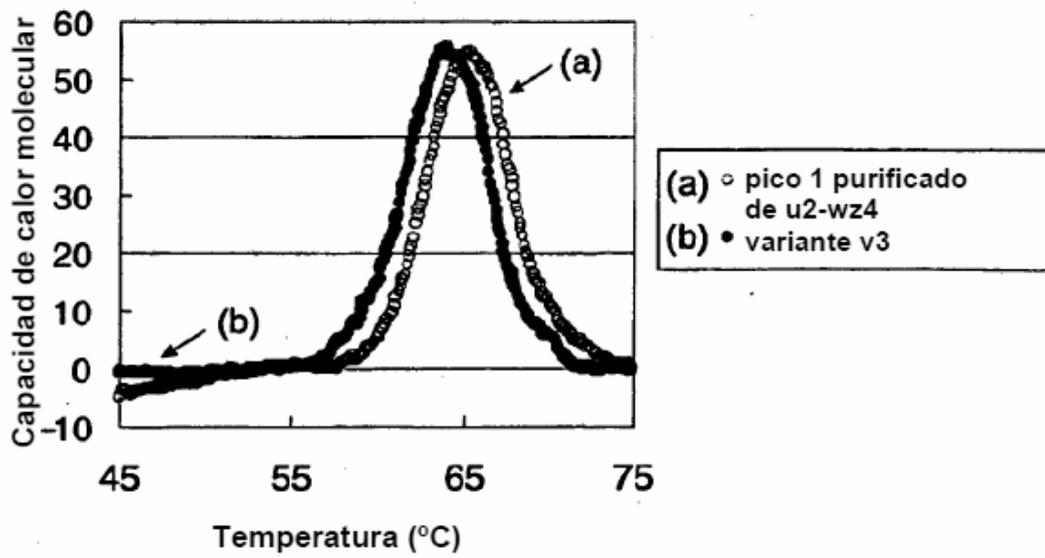
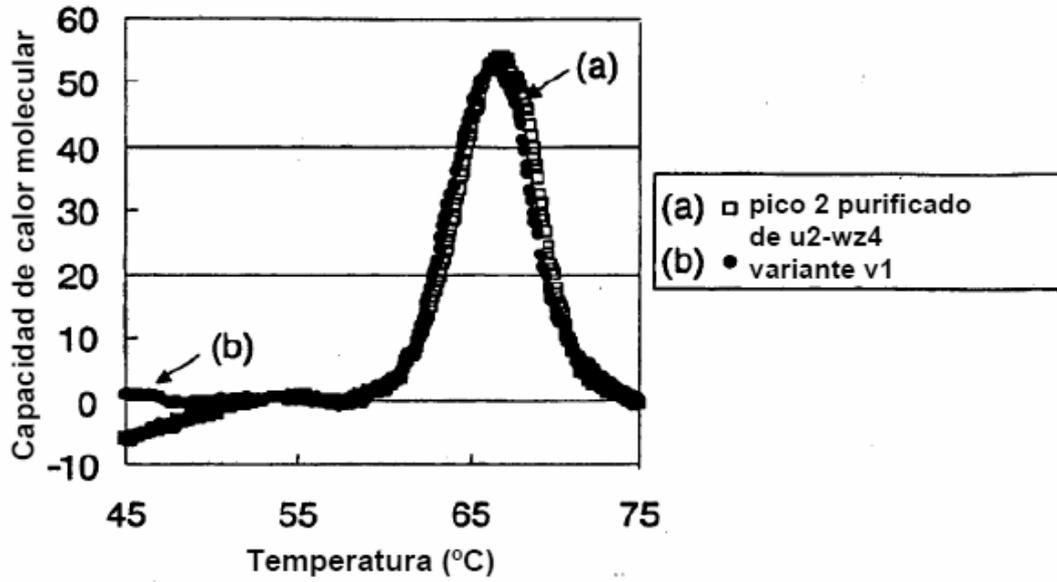


FIG. 24

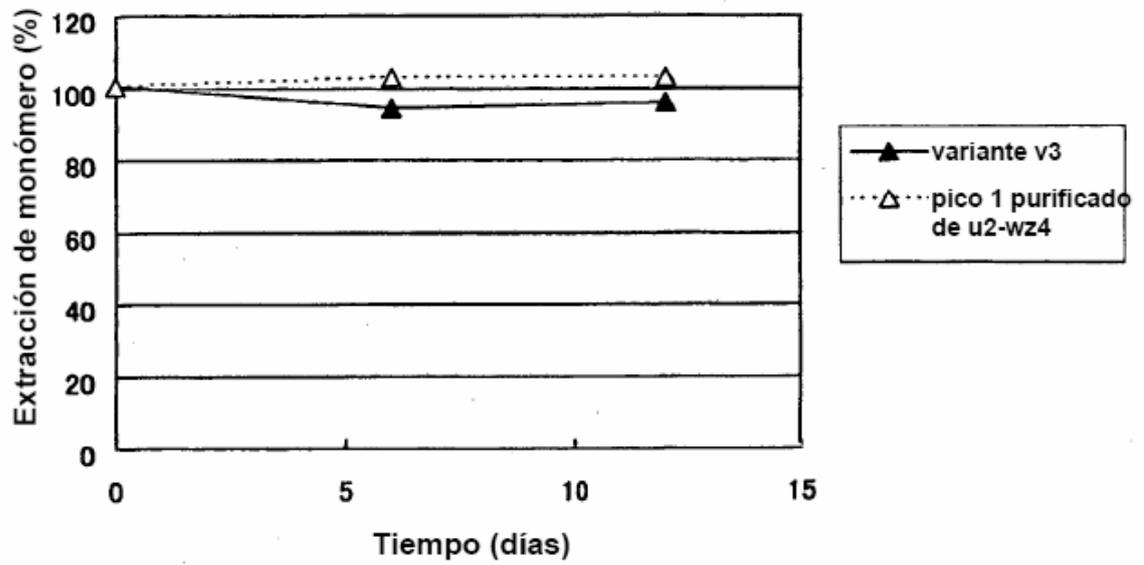
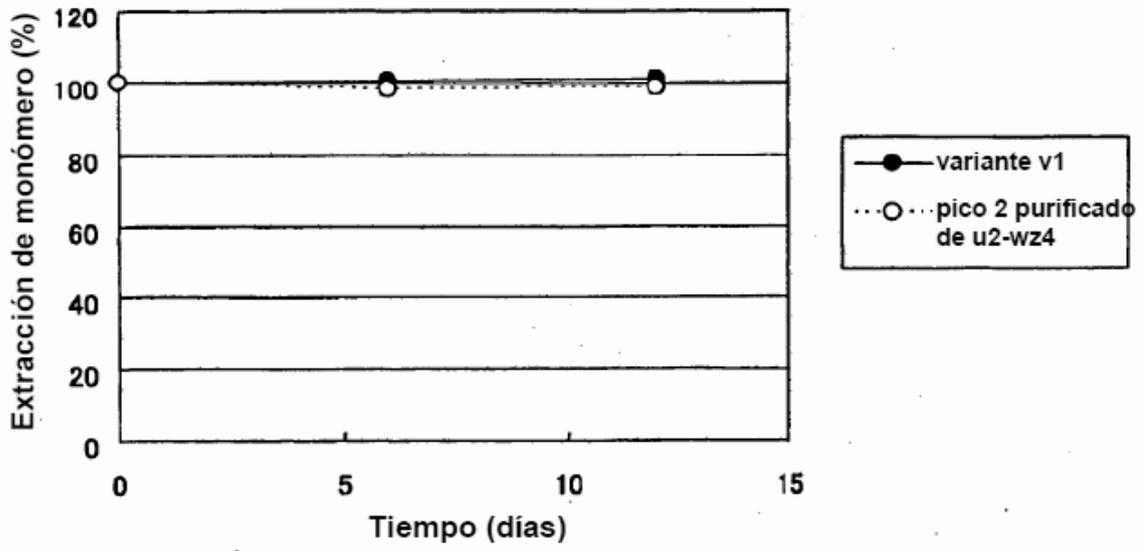


FIG. 25

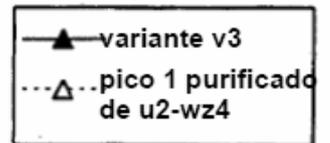
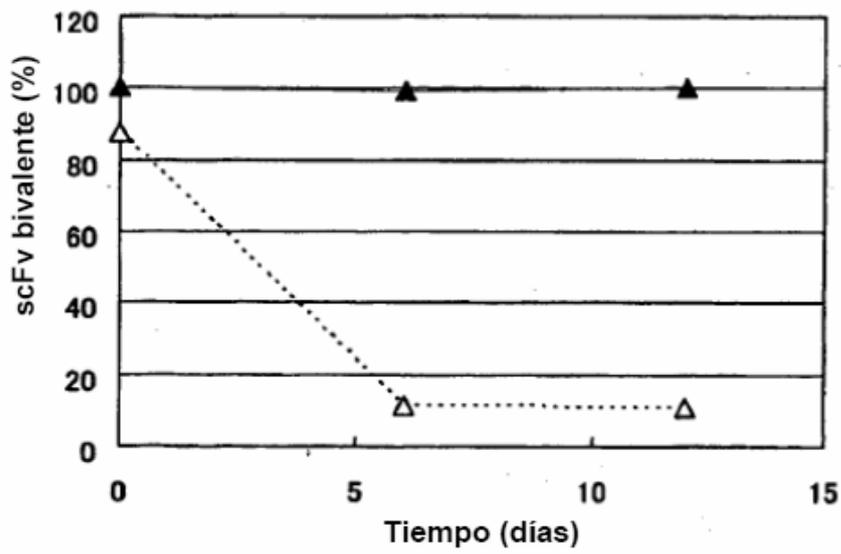
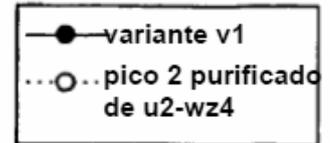
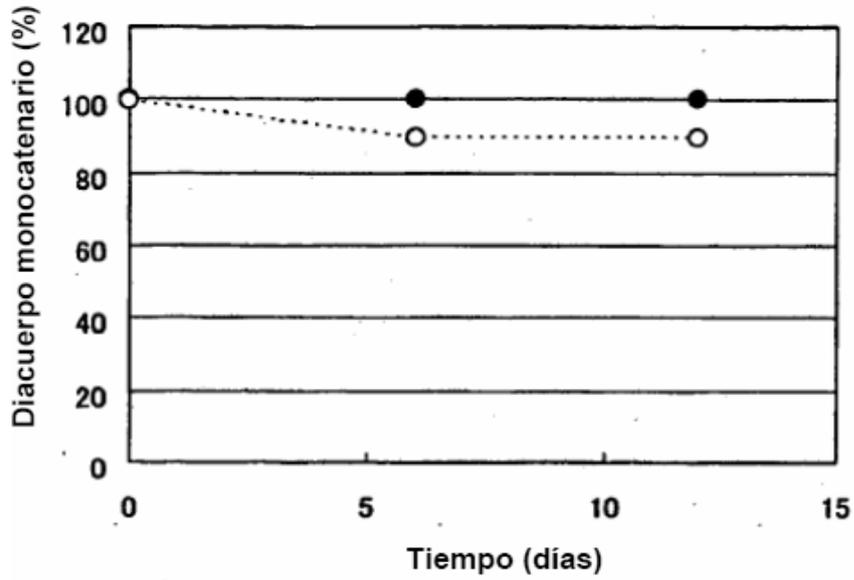


FIG. 26

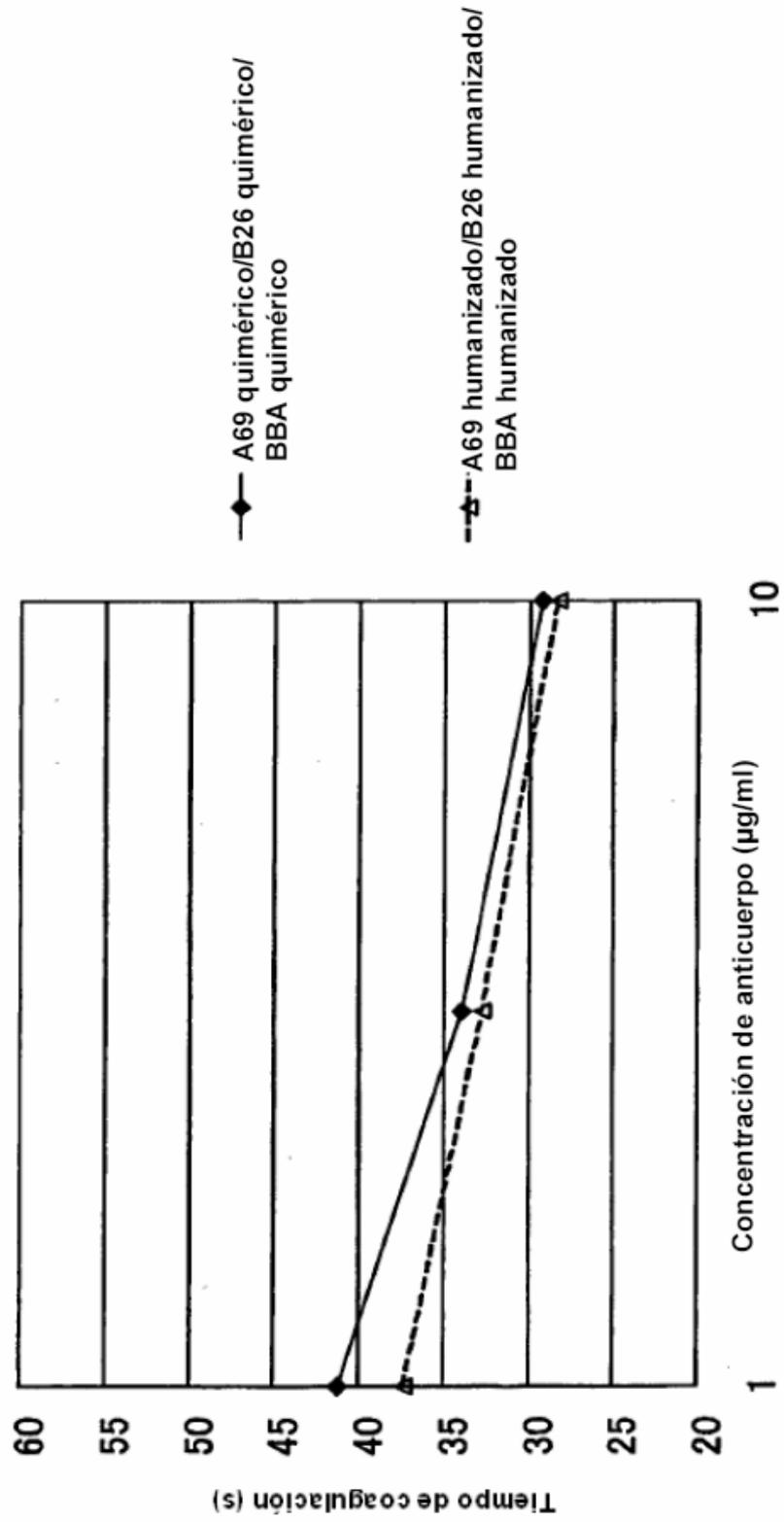


FIG. 27

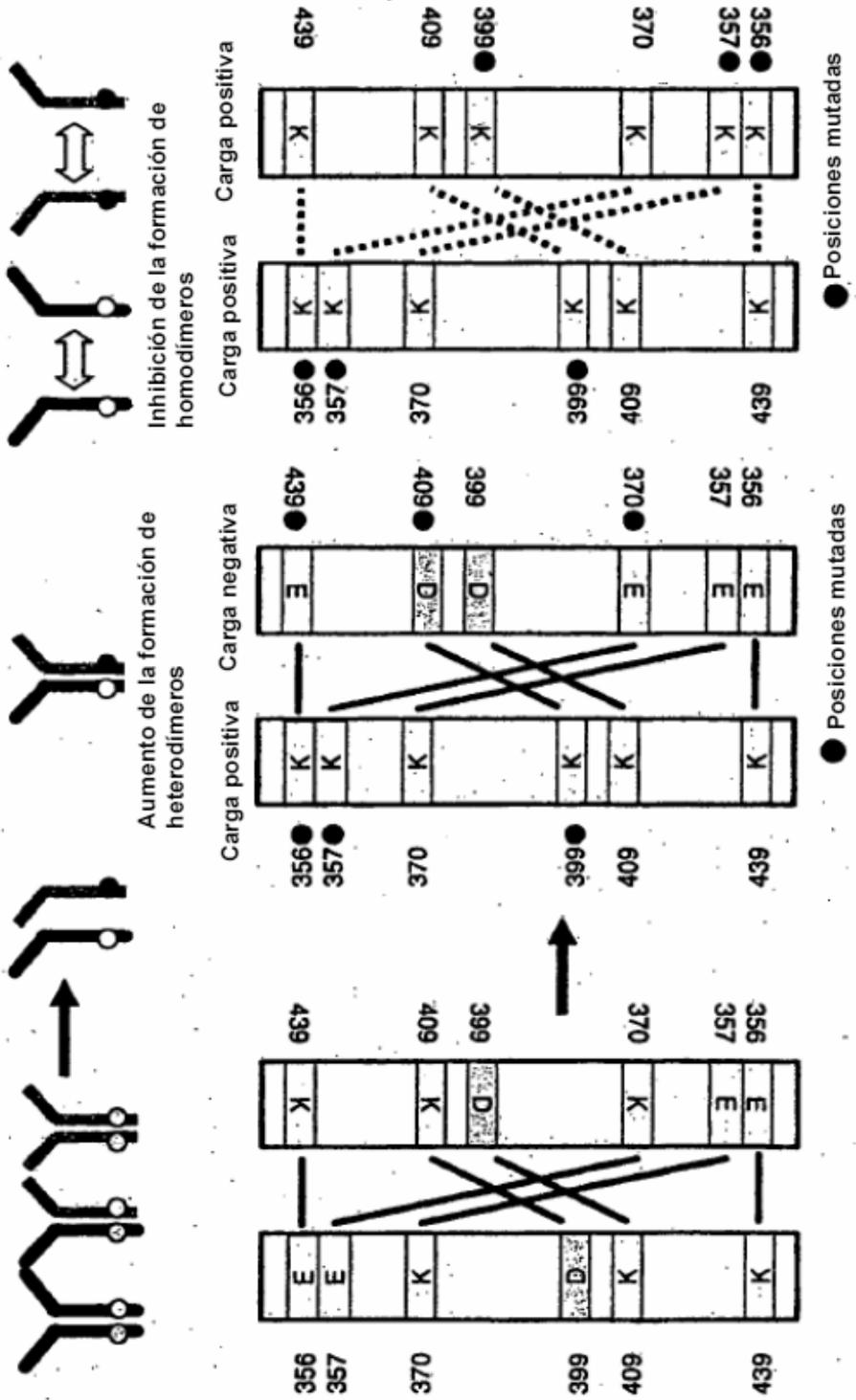


FIG. 28

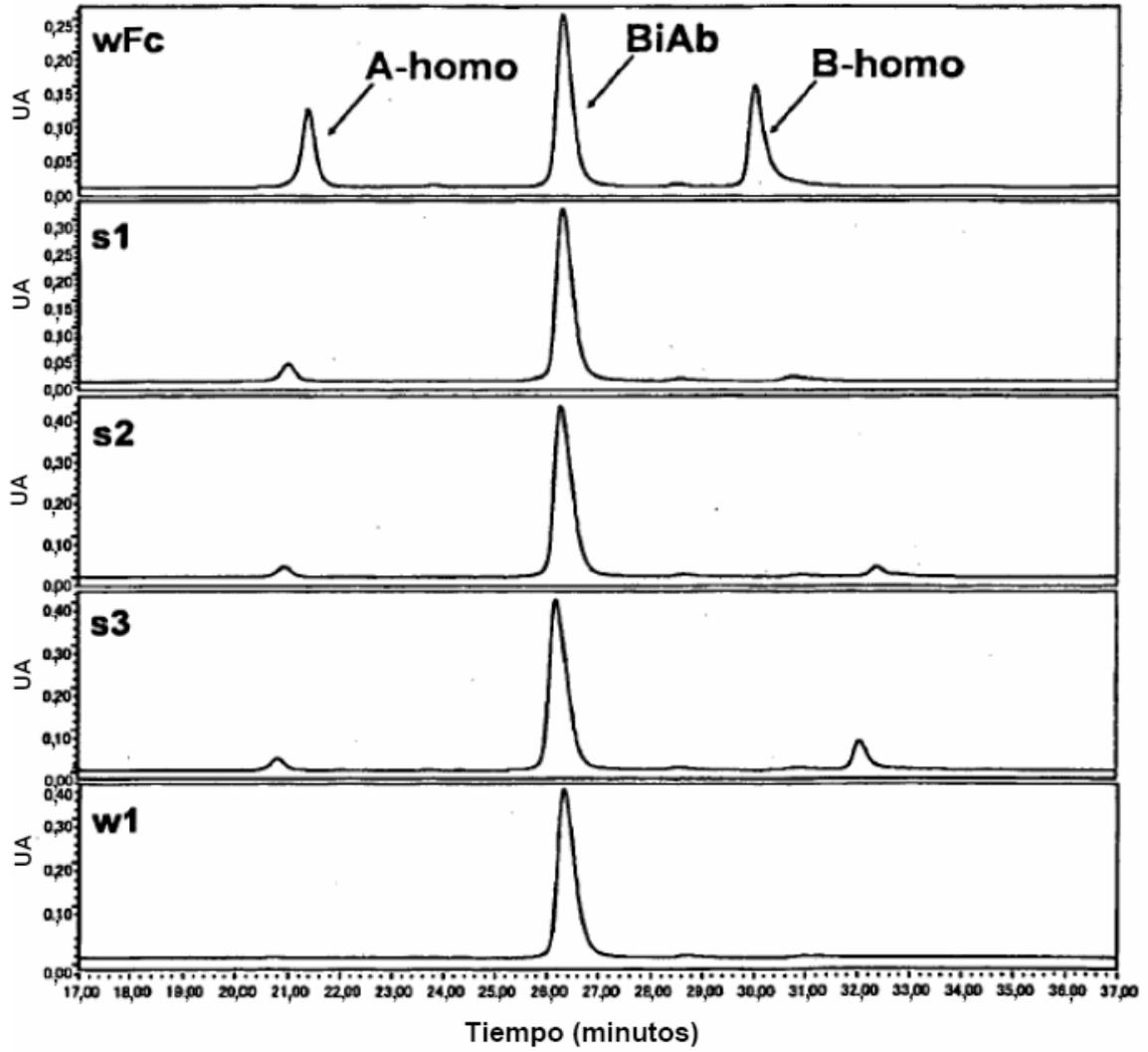


FIG. 29

Nombre	A-Homo	BiAb	B-Homo
Tipo silvestre	20	48	32
KIH	0	97	3
s1	8	87	5
s2	5	92	3
s3	3	92	6
w1	1	97	2
w2	0	94	6
w3	4	93	3

Nombre	A-Homo	BiAb	B-Homo
Tipo silvestre	21	49	30
KIH	0	99	1
s1C	5	94	1
s2C	11	87	2
s3C	3	88	10
w3C	3	95	2
w3C2	6	93	1

FIG. 30

Nombre Tasa de recuperación de monómeros (%)	
Tipo silvestre	66
KiH	36
s2	39
s3	72
w3	47
s2C	81
s3C	79
w3C	83
w3C2	74

FIG. 31

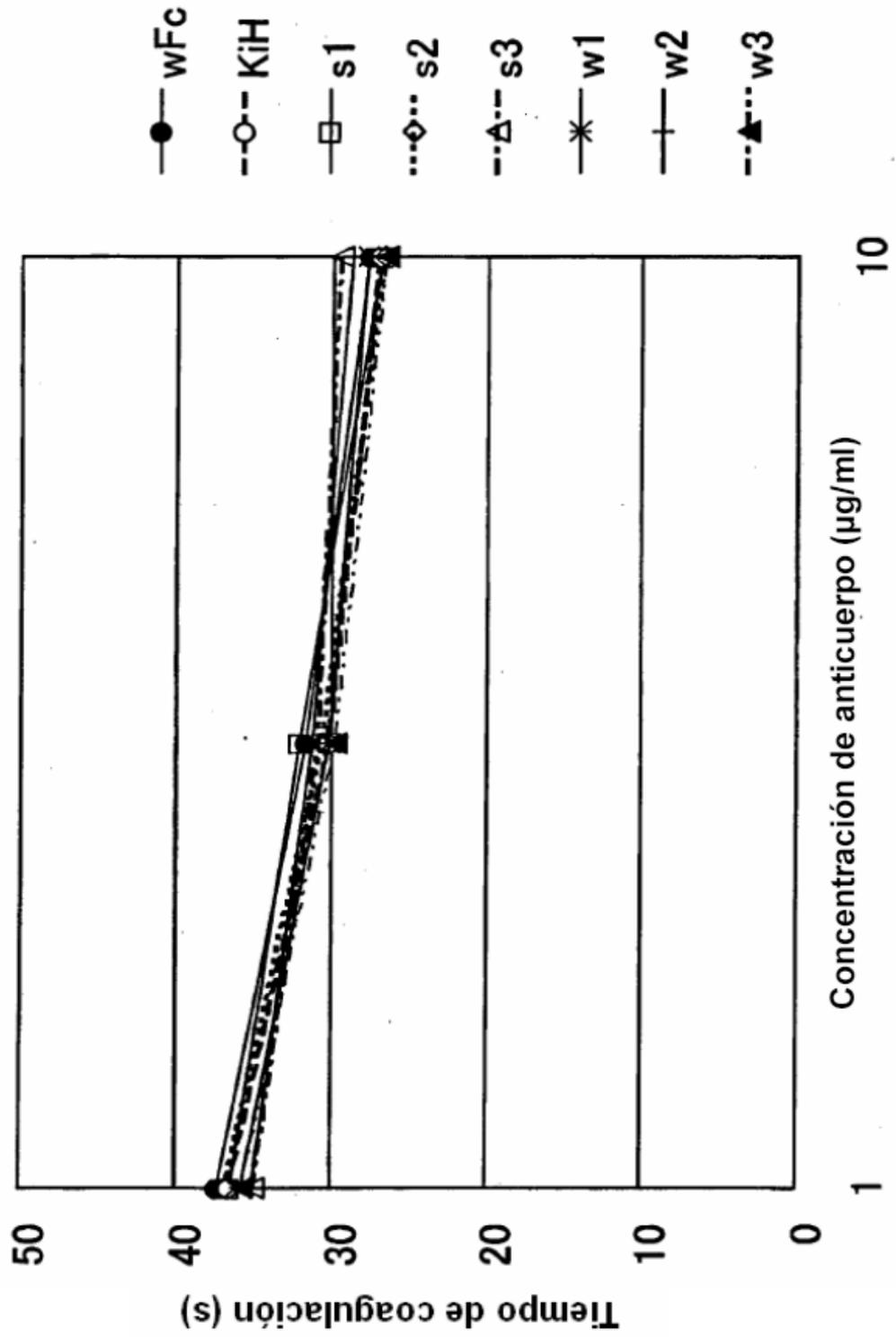


FIG. 32

Nombre	A-Homo	BiAb	B-Homo
Tipo silvestre	24	50	27
KiH	0	99	1
w1	0	98	2
w2	0	98	2
w3	4	94	2