

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 638**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2008** **PCT/JP2008/067534**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2009** **WO09041643**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2008** **E 08834150 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016** **EP 2202245**

54 Título: **Método para modificar el punto isoelectrico de un anticuerpo mediante la sustitución de aminoácidos en una CDR**

30 Prioridad:

26.09.2007 JP 2007250165

28.09.2007 JP 2007256063

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.01.2017

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;
TSUNODA, HIROYUKI;
TACHIBANA, TATSUHIKO y
KURAMOCHI, TAICHI

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 595 638 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

Método para modificar el punto isoelectrico de un anticuerpo mediante la sustitución de aminoácidos en una CDR

5 Campo técnico

La presente divulgación se refiere a métodos para modificar el punto isoelectrico (pI) de una CDR; métodos para controlar la farmacocinética de anticuerpo en plasma (farmacocinética en sangre); composiciones farmacéuticas que comprenden como un principio activo un anticuerpo con un punto isoelectrico modificado; métodos para producir las composiciones; y similares.

La presente divulgación también se refiere a métodos para controlar las semividas en plasma de anticuerpos anti receptor de IL-6, anticuerpos anti glipicano 3 y anticuerpos anti receptor de IL-31 modificando restos de aminoácidos que se exponen en la superficie de las regiones CDR de los anticuerpos; anticuerpos (anticuerpos anti receptor de IL-6, anticuerpos anti glipicano 3 y anticuerpos anti receptor de IL-31), cuya semivida en plasma se controla mediante la modificación de restos de aminoácidos; composiciones farmacéuticas que comprenden dicho anticuerpo como un principio activo; y métodos para producir las composiciones.

Además, la presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti receptor de IL-6 como un principio activo, métodos para producir las composiciones y similares.

Antecedentes de la técnica

Los anticuerpos están atrayendo atención como productos farmacéuticos ya que tienen larga semivida disponible en el mercado y muchos productos farmacéuticos de anticuerpos están desarrollándose en la actualidad (Documentos No de patente 1 y 2). La mayoría de los productos farmacéuticos de anticuerpo disponibles en el mercado son anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. En la actualidad, se están desarrollando muchos productos farmacéuticos de anticuerpos que tienen características superiores con eficacia farmacológica, conveniencia y coste mejorados a partir de la modificación de anticuerpos humanos o anticuerpos humanizados. Se han desarrollado diversas tecnologías aplicables a estos productos farmacéuticos de anticuerpos, incluyendo las que potencian la función efectora, la actividad de unión a antígeno, la farmacocinética o la estabilidad, y las que reducen el riesgo de inmunogenicidad. Para métodos para potenciar la eficacia farmacológica o reducir la dosificación, se han presentado técnicas que potencian la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) mediante sustitución de aminoácidos en el dominio Fc de un anticuerpo IgG (Documentos No de patente 3 y 4). Además, se ha presentado maduración de afinidad como una técnica para potenciar la actividad de unión a antígeno o actividad neutralizante de antígeno (Documento No de patente 5). Esta técnica permite la potenciación de la actividad de unión a antígeno mediante la introducción de mutaciones de aminoácidos en la región CDR de una región variable o similar.

Un problema encontrado con los productos farmacéuticos de anticuerpos actuales es el alto coste de producción asociado con la administración de cantidades extremadamente grandes de proteína. Se cree que la forma preferida de administración es formulación subcutánea para enfermedades autoinmunitarias crónicas. En general, es necesario que las formulaciones subcutáneas sean formulaciones de alta concentración. Desde la perspectiva de la estabilidad o similares, se cree en general que el límite de concentración para formulaciones de anticuerpo de tipo IgG es de aproximadamente 100 mg/ml (Documento No de patente 6). Pueden proporcionarse productos farmacéuticos de anticuerpo convenientes, de bajo coste, con más características superiores que pueden administrarse por vía subcutánea en intervalos más largos aumentando la semivida de un anticuerpo en el plasma para prolongar su efecto terapéutico y reducir de este modo el aumento de la proteína administrada.

FcRn está implicado estrechamente en la semivida en plasma larga de anticuerpos. Se sabe que la semivida en plasma de anticuerpos es diferente entre isotipos de anticuerpos. IgG1 e IgG2 tienen la semivida en plasma más larga, mientras que IgG3 e IgG4 tienen una semivida más corta (Documento No de patente 7). Un método presentado para prolongar las semividas en plasma de anticuerpos IgG1 e IgG2, que tienen una semivida en plasma superior, comprende sustituir aminoácidos en la región constante para potenciar la unión con FcRn (Documentos No de patente 8 a 10). Sin embargo, la introducción de mutaciones de aminoácidos artificiales en una región constante se encuentra con el problema de la inmunogenicidad. Por otro lado, se ha presentado recientemente un método que comprende introducir mutaciones de aminoácidos en regiones variables de anticuerpos para mejorar la farmacocinética de anticuerpos (Documento de Patente 1).

El Documento de Patente 1 describe que la farmacocinética de IgG puede controlarse modificando su punto isoelectrico, y la semivida en plasma de un anticuerpo puede prolongarse reduciendo el punto isoelectrico del anticuerpo sin pérdida de actividad de unión a antígeno mediante introducción de sustituciones de aminoácidos en el marco conservado de región variable de anticuerpo. Específicamente, el punto isoelectrico de un anticuerpo puede reducirse sin pérdida de actividad de unión a antígeno, por ejemplo, introduciendo sustituciones de aminoácidos en H10, H12, H23, H39, H43 y H105, numeración de Kabat. También es posible introducir mutaciones de aminoácidos en otras secuencias de marco conservado sin pérdida de actividad de unión. En algunos casos, sin embargo, se

5 cree que la introducción de sustituciones de aminoácidos en secuencias de marco conservado solamente es insuficiente para una reducción significativa del punto isoeléctrico. Esto se debe a que se usa en general una secuencia de anticuerpo humano como una secuencia de marco conservado después de sustitución de aminoácidos para reducir la inmunogenicidad, pero las secuencias de marco conservado de anticuerpos humanos están
 10 altamente conservadas y tienen baja diversidad, y por lo tanto hay poca flexibilidad para sustitución de aminoácidos. Por lo tanto, cuando la sustitución de aminoácidos en el marco conservado solamente es insuficiente para reducir el punto isoeléctrico de un anticuerpo, sería difícil reducir adicionalmente el punto isoeléctrico.

10 Por el contrario, las secuencias de CDR tienen una enorme diversidad debido a mutaciones somáticas, y debido a que tienen la diversidad necesaria para adquirir actividad de unión a antígeno, hay flexibilidad significativamente mayor para sustitución de aminoácidos en comparación con secuencias de marco conservado. Sin embargo, se cree en general que la sustitución de aminoácidos en secuencia de CDR afecta a la actividad de unión a antígeno de un anticuerpo, ya que la secuencia de CDR es el factor más importante para actividad de unión a antígeno fuerte. Por lo tanto, es difícil reducir el punto isoeléctrico de un anticuerpo sustituyendo aminoácidos en su secuencia de CDR sin
 15 pérdida considerable de actividad de unión a antígeno. Además, la secuencia de CDR varía en gran medida dependiendo del tipo de antígeno; por lo tanto, independientemente de la especificidad del anticuerpo, se ha creído que es muy difícil sustituir aminoácidos en una secuencia de CDR de anticuerpo sin pérdida considerable de la actividad de unión a antígeno del anticuerpo. De hecho, esto puede inferirse a partir de muchos hallazgos descritos posteriormente.

20 En general, los anticuerpos derivados de una especie animal no humana se humanizan mediante injerto de CDR, en el que una secuencia de marco conservado humana se injerta en la secuencia de CDR de la especie animal no humana. Si un anticuerpo humanizado por injertos de CDR no tiene una actividad de unión comparable como el anticuerpo quimérico, la actividad de unión puede recuperarse de sustitución de una parte de la secuencia de marco conservado que determina la estructura de CDR con aminoácidos de la secuencia de marco conservado del anticuerpo de la especie animal no humana de la que deriva el anticuerpo (Documento No de patente 11). La secuencia y estructura de CDR son muy importantes para la actividad de unión a antígeno y especificidad de un anticuerpo. Además, se sabe en general que la actividad de unión a antígeno de un anticuerpo se reduce cuando se modifican restos de CDR de anticuerpo mediante isomerización de restos de ácido aspártico, desamidación de
 25 restos de ácido aspártico u oxidación de restos de metionina en CDR de anticuerpo (Documento No de patente 12), y esto también sugiere que la secuencia de CDR es muy importante para la actividad de unión a antígeno de anticuerpos. Además, se ha presentado adicionalmente que no solamente la actividad de unión a antígeno sino también el nivel de expresión de un anticuerpo se reduce con frecuencia de forma considerable cuando se introducen sustituciones de aminoácidos en la secuencia de CDR2 de cadena pesada de un anticuerpo (Documentos No de patente 13 a 15). En particular, se sabe que el nivel de expresión de un anticuerpo está notablemente reducido cuando se introduce una sustitución de aminoácidos en H51 (Documento No de patente 16). Además, se ha indicado que la actividad de unión a antígeno está considerablemente reducida en casi todos los casos cuando se introducen mutaciones en la secuencia de CDR3 de cadena pesada de un anticuerpo (Documentos No de patente 17 y 18). Como alternativa, la actividad de unión a antígeno de un anticuerpo se reduce con frecuencia notablemente cuando se sustituyen aminoácidos en la CDR de anticuerpo con alanina por mutagénesis de exploración de alanina (Documentos No de patente 19 a 23). Se cree que el efecto de la sustitución de alanina en la actividad de unión a antígeno depende de la especificidad del anticuerpo. En resumen, se considera en general que la actividad de unión a antígeno de un anticuerpo está reducida por sustitución de aminoácidos en la secuencia de CDR, y no hay ningún informe previo sobre las posiciones de aminoácidos cuya sustitución no reduce
 35 significativamente la actividad de unión a antígeno de un anticuerpo independientemente de su especificidad de anticuerpo.

En la ingeniería de anticuerpos para producir moléculas de anticuerpo con más características superiores, casi todas las sustituciones de aminoácidos introducidas en secuencias de CDR de anticuerpos están dirigidas a la maduración de afinidad. La maduración de afinidad es un método para obtener anticuerpos con una actividad de unión a antígeno mejorada, y se realiza en general presentando en fagos o ribosomas una biblioteca de anticuerpos que comprende secuencias de CDR aleatorias derivadas de las secuencias de CDR de una molécula de anticuerpo y selección en el antígeno. Este método permite el descubrimiento de sustituciones de aminoácidos en secuencias de CDR de anticuerpos que mejoran la actividad de unión a antígeno (Documentos No de patente 5 y 24 a 26). Sin embargo, las sustituciones de aminoácidos descubiertas por el método descrito anteriormente que mejoran la actividad de unión a antígeno son diferentes dependiendo de la especificidad de anticuerpo. Por lo tanto, no hay ningún informe previo sobre posiciones de aminoácidos en secuencias de CDR cuya sustitución mejore la actividad de unión a antígeno independientemente de la especificidad del anticuerpo. Aparte de la maduración de la afinidad para modificar la secuencia de CDR, se presentan métodos para mejorar los niveles de expresión de anticuerpos en células de mamífero sustituyendo aminoácidos en posiciones específicas en la secuencia de CDR (Documento de Patente 2). De acuerdo con el Documento de Patente 2, los niveles de expresión de anticuerpos en células de mamífero pueden mejorarse independientemente de la especificidad de anticuerpo sustituyendo aminoácidos en posiciones específicas en la secuencia de CDR con una secuencia particular. Como alternativa, algunos informes describen la desimmunización en la que la inmunogenicidad de un anticuerpo se reduce evitando epítomos de linfocitos T en la secuencia de CDR de anticuerpo. Sin embargo, no hay ningún informe previo sobre métodos para sustituir aminoácidos en un anticuerpo, independientemente de su especificidad de anticuerpos, para retirar epítomos
 50
 55
 60
 65

de linfocitos T de la secuencia de CDR sin pérdida de actividad de unión (Documentos No de patente 27 y 28).

Como se ha descrito anteriormente, la secuencia de CDR de anticuerpo está implicada estrechamente en la unión a antígeno. Por lo tanto, las sustituciones de aminoácidos en secuencia de CDR generalmente alteran la actividad de unión. El efecto de la sustitución de aminoácidos en secuencia de CDR o unión a antígeno difiere dependiendo de la especificidad del anticuerpo. El Documento de Patente 1 describe algunos ejemplos sobre el control del punto isoelectrónico mediante sustitución de aminoácidos en CDR; sin embargo, la actividad de unión a antígeno puede alterarse en algunos tipos de anticuerpos. Como alternativa, se han presentado métodos para mejorar la expresión de anticuerpos independientemente de la especificidad de anticuerpo por sustituciones de aminoácidos comunes; sin embargo, no hay ningún informe previo sobre métodos para mejorar la actividad de unión a antígeno de un anticuerpo o retirar epítomos de linfocitos T sin pérdida considerable de actividad de unión a antígeno de un anticuerpo. No hay ningún informe en absoluto sobre secuencias de CDR de anticuerpos cuyos aminoácidos puedan sustituirse sin pérdida considerable de la actividad de unión a antígeno del anticuerpo independientemente de la especificidad del anticuerpo.

Se describen a continuación documentos de técnica anterior relacionada para la presente invención.

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

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

[Documento No de patente 3] Presta LG. Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. *Adv Drug Deliv Rev.* 7 Ago 2006; 58(5-6): 640-56

[Documento No de patente 4] Kim SJ, Park Y, Hong HJ. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Mol Cells.* 31 Ago 2005; 20(1): 17-29 Revisión

[Documento No de patente 5] Fujii I. Antibody affinity maturation by random mutagenesis. *Methods Mol Biol.* (2004) 248: 345-59

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

[Documento No de patente 7] Salfeld JG. Isotype selection in antibody engineering. *Nat Biotechnol.* Dic 2007; 25(12): 1369-72

[Documento No de patente 8] Hinton PR, Johlfs MG, Xiong JM, Hanestad K, Ong KC, Bullock C, Keller S, Tang MT, Tso JY, Vasquez M, Tsurushita N. Engineered human IgG antibodies with longer serum half-lives in primates. *J Biol Chem.* 20 Feb 2004; 279(8): 6213-6

[Documento No de patente 9] Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N. An engineered human IgG antibody with longer serum half-life. *J Immunol.* 1 Ene 2006; 176(1): 346-56

[Documento No de patente 10] Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES. Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis. *Nat Biotechnol.* Jul 1997; 15(7): 637-40

[Documento No de patente 11] Almagro JC, Fransson J. Humanization of antibodies. *Front Biosci.* 1 Ene 2008; 13: 1619-33

[Documento No de patente 12] Liu H, Gaza-Bulsecu G, Faldu D, Chumsae C, Sun J. Heterogeneity of monoclonal antibodies. *J Pharm Sci.* Jul 2008; 97(7): 2426-47

[Documento No de patente 13] Chen C, Roberts VA, Rittenberg MB. Generation and analysis of random point mutations in an antibody CDR2 sequence: many mutated antibodies lose their ability to bind antigen. *J Exp Med.* 1 Sep 1992; 176(3): 855-66

[Documento No de patente 14] Chen C, Martin TM, Stevens S, Rittenberg MB. Defective secretion of an immunoglobulin caused by mutations in the heavy chain complementarity determining region 2. *J Exp Med.* 1 Ago 1994; 180(2): 577-86

[Documento No de patente 15] Wiens GD, Heldwein KA, Stenzel-Poore MP, Rittenberg MB. Somatic mutation in VH complementarity-determining region 2 and framework region 2: differential effects on antigen binding and Ig secretion. *J Immunol.* 1 Ago 1997; 159(3): 1293-302

[Documento No de patente 16] Wiens GD, Lekkerkerker A, Veltman I, Rittenberg MB. Mutation of a single conserved residue in VH complementarity-determining region 2 results in a severe Ig secretion defect. *J Immunol.* 15 Ago 2001; 167(4): 2179-86

[Documento No de patente 17] Zwick MB, Komori HK, Stanfield RL, Church S, Wang M, Parren PW, Kunert R, Katinger H, Wilson IA, Burton DR. The long third complementarity-determining region of the heavy chain is important in the activity of the broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5. *J Virol.* Mar 2004; 78(6): 3155-61

[Documento No de patente 18] Komissarov AA, Marchbank MT, Calcutt MJ, Quinn TP, Deutscher SL. Site-specific mutagenesis of a recombinant anti-single-stranded DNA Fab. Role of heavy chain complementarity-determining region 3 residues in antigen interaction. *J Biol Chem.* 24 Oct 1997; 272(43): 26864-70

[Documento No de patente 19] Gerstner RB, Carter P, Lowman HB. Sequence plasticity in the antigen-binding site of a therapeutic anti-HER2 antibody. *J Mol Biol.* 30 Ago 2002; 321(5): 851-62

[Documento No de patente 20] Vajdos FF, Adams CW, Breece TN, Presta LG, de Vos AM, Sidhu SS. Comprehensive functional maps of the antigen-binding site of an anti-ErbB2 antibody obtained with shotgun

scanning mutagenesis. J Mol Biol. 5 Jul 2002; 320(2): 415-28

[Documento No de patente 21] Pons J, Rajpal A, Kirsch JF. Energetic analysis of an antigen/antibody interface: alanine scanning mutagenesis and double mutant cycles on the HyHEL-10/lysozyme interaction. Potein Sci. May 1999; 8(5): 958-68

[Documento No de patente 22] Leong SR, DeForge L, Presta L, Gonzalez T, Fan A, Reichert M, Chuntharapai A, Kim KJ, Tumas DB, Lee WP, Gribling P, Snedecor B, Chen H, Hsei V, Schoenhoff M, Hale V, Deveney J, Koumenis I, Shahrokh Z, McKay P, Galan W, Wagner B, Narindray D, Hebert C, Zapata G. Adapting pharmacokinetic properties of a humanized anti-interleukin-8 antibody for therapeutic applications using site-specific pegylation. Cytokine. 7 Nov 2001; 16(3): 106-19

[Documento No de patente 23] Xiang J, Srivamadan M, Rajala R, Jia Z. Study of B72.3 combining sites by molecular modeling and site-directed mutagenesis. Protein Eng. May 2000; 13(5): 339-44

[Documento No de patente 24] Rothe A, Hosse RJ, Power BE. Ribosome display for improved biotherapeutic molecules. Expert Opin Biol Ther. Feb 2006; 6(2): 177-87

[Documento No de patente 25] Schmitz U, Versmold A, Kaufmann P, Frank HG. Phage display: a molecular tool for the generation of antibodies--a review. Placenta. Mar-Apr 2000; 21 Supl A: S106-12

[Documento No de patente 26] Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R. A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries. Proc Natl Acad Sci USA. 14 Jun 2005; 102(24): 8466-71

[Documento No de patente 27] De Groot AS, Knopp PM, Martin W. De-immunization of therapeutic proteins by T-cell epitope modification. Dev Biol (Basel). (2005) 122: 171-94

[Documento No de patente 28] http://www.algonomics.com/proteinengineering/tripole_applications.php

[Documento de Patente 1] WO/2007/114319

[Documento de Patente 2] US/2006/0019342

Divulgación de la invención

[Problemas para resolver por la invención]

La presente invención se consiguió a la vista de las circunstancias anteriores. La invención se refiere a las realizaciones como se definen en las reivindicaciones.

La invención se refiere a un método para controlar la farmacocinética de un anticuerpo IgG conservando al mismo tiempo la actividad de unión a antígeno de la región variable y a un método para producir dicho anticuerpo IgG. La invención también se refiere a un método para producir un anticuerpo IgG multiespecífico cuya farmacocinética en plasma se controla mientras que se conserva la actividad de unión a antígeno de la región variable, comprendiendo dicho anticuerpo un primer polipéptido y un segundo polipéptido cada uno de los cuales comprende una región variable de anticuerpo.

También se desvelan composiciones farmacéuticas que comprenden como un principio activo un anticuerpo con semivida en plasma controlada y métodos para producir las composiciones farmacéuticas que comprenden el anticuerpo como un principio activo.

Otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar métodos para controlar las semividas en plasma de anticuerpos anti receptor de IL-6, anticuerpos anti glipicano 3 y anticuerpos anti receptor de IL-31 modificando los restos de aminoácidos expuestos en la superficie de las regiones CDR de los anticuerpos; anticuerpos anti receptor de IL-6, anticuerpos anti glipicano 3 y anticuerpos anti receptor de IL-31 cuya semivida en plasma se controla modificando restos de aminoácidos; métodos para producir dichos anticuerpos; y composiciones farmacéuticas que comprenden dicho anticuerpo como un principio activo.

Además, otro objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden moléculas de segunda generación, que son superiores al anticuerpo IgG1 anti receptor de IL-6 humanizado TOCILIZUMAB, y métodos para producir dichas composiciones farmacéuticas. Las moléculas de segunda generación se han mejorado para mostrar actividad neutralizante de antígenos y conservación en plasma potenciada, y de este modo producir un efecto terapéutico prolongado incluso cuando se reduce la frecuencia de administración; y también se han mejorado para tener inmunogenicidad reducida y propiedades de seguridad y físicas mejoradas, modificando secuencias de aminoácidos de las regiones variable y constante de TOCILIZUMAB.

[Medio para resolver los problemas]

Los presentes inventores realizaron estudios dedicados sobre métodos para modificar el punto isoeléctrico de polipéptidos que comprenden una región variable de anticuerpo conservando al mismo tiempo la actividad de unión a antígeno de la región variable. Como resultado, los presentes inventores han identificado posiciones de aminoácidos específicas dentro de la secuencia de aminoácidos de una región determinante de complementariedad (CDR) de una región variable de anticuerpo, que permiten la modificación del punto isoeléctrico conservando al mismo tiempo la actividad de unión a antígeno de la región variable. Además, los presentes inventores descubrieron

que la semivida en plasma de un polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo podría regularse controlando el punto isoelectrico del polipéptido, y que podrían producirse eficazmente heteromultímeros de un polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo utilizando diferencias en el punto isoelectrico. Específicamente, los presentes inventores identificaron posiciones de aminoácidos específicas en una secuencia de CDR que constituye una región variable de anticuerpo, que permiten controlar la carga en la superficie de una molécula de anticuerpo sin afectar a la estructura y función del anticuerpo tal como la actividad de unión a antígeno de la región variable de anticuerpo. Además, los presentes inventores demostraron que la semivida en plasma de un polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo podría regularse controlando la carga en la superficie de anticuerpo para modificar el punto isoelectrico, y que los anticuerpos con semividas en plasma controladas conservaban de hecho sus actividades de unión a antígeno. Además, los presentes inventores demostraron que el efecto supresor de crecimiento de tumores de anticuerpos que muestran citotoxicidad en células cancerosas podría potenciarse controlando la semivida en plasma de los anticuerpos, y de este modo completar la presente invención. Además, los presentes inventores demostraron que podrían aislarse heterodímeros que comprenden anticuerpos que se unen con dos o más tipos diferentes de antígenos y purificarse modificando sus puntos isoelectricos controlando la carga de CDR.

Además, los presentes inventores realizaron estudios dedicados para producir moléculas de segunda generación que son superiores al anticuerpo IgG1 anti receptor de IL-6 humanizado de primera generación TOCILIZUMAB, y se han mejorado para mostrar eficacia farmacológica y conservación en plasma potenciadas, y de este modo producir un efecto terapéutico prolongado incluso cuando se reduce la frecuencia de administración. También se han mejorado para tener inmunogenicidad reducida y propiedades de seguridad y físicas mejoradas (estabilidad y homogeneidad), modificando secuencias de aminoácidos de las regiones variables y constantes de TOCILIZUMAB. Como resultado, los presentes inventores descubrieron múltiples mutaciones de CDR en las regiones variables de TOCILIZUMAB que permiten mejorar la actividad de unión a antígeno (afinidad). Los presentes inventores mejoraron por lo tanto con éxito la afinidad significativamente usando una combinación de dichas mutaciones. Los presentes inventores también mejoraron con éxito la conservación en plasma modificando la secuencia de región variable para reducir el punto isoelectrico de un anticuerpo. Además, los presentes inventores redujeron con éxito el riesgo de inmunogenicidad retirando algunos de los péptidos epitópicos de linfocitos T predichos por ordenador en las regiones variables y las secuencias de ratón que permanecen en el marco conservado de TOCILIZUMAB. Además, los presentes inventores aumentaron con éxito la estabilidad a mayores concentraciones. Además, los presentes inventores también descubrieron con éxito secuencias de región constante nuevas que no se unen con receptor de Fcγ y que mejoran la estabilidad en condiciones ácidas, heterogeneidad originada de enlaces disulfuro en la región bisagra, heterogeneidad originada del extremo C terminal de cadena pesada y estabilidad en formulaciones de alta concentración, minimizando al mismo tiempo la generación de nuevos péptidos epitópicos de linfocitos T en la región constante de TOCILIZUMAB. Los presentes inventores descubrieron con éxito moléculas de segunda generación que eran superiores a TOCILIZUMAB combinando modificaciones de secuencia de aminoácidos en las regiones CDR, variables y constantes.

Más específicamente, la presente invención proporciona:

[1] un método para modificar el punto isoelectrico de un polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo conservando al mismo tiempo la actividad de unión a antígeno de la región variable, que comprende modificar la carga de al menos un resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de la región determinante de complementariedad (CDR) del polipéptido.

También se desvela:

[2] el método de [1], en el que el polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo comprende además un dominio de unión a FcRn;

[3] el método de [1], en el que el polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo es un anticuerpo IgG;

[4] el método de [1], en el que el polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo es un anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o anticuerpo humano;

[5] el método de [1], en el que el polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo es un polipéptido multiespecífico que se une con al menos dos tipos de antígenos;

[6] el método de [1], en el que la carga del resto de aminoácido se modifica mediante sustitución de aminoácidos;

[7] el método de [1], en el que la modificación de la carga del resto de aminoácido da como resultado un cambio de 1,0 o más en el punto isoelectrico teórico;

[8] el método de [1], en el que el resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de la región CDR es al menos un resto de aminoácido seleccionado de restos de aminoácidos en las posiciones 31, 61, 62, 64 y 65 en la región variable de cadena pesada y en las posiciones 24, 27, 53, 54 y 55 en la región variable de cadena ligera de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat;

[9] un polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo con un punto isoelectrico modificado, que se obtiene por el método de uno cualquiera de [1] a [8];

[10] un método para controlar la farmacocinética en plasma de un polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo, que comprende modificar el punto isoelectrico del polipéptido por el método de uno

cualquiera de [1] a [8];

[11] el método de [10], en el que el control de la farmacocinética se refiere a aumentar o reducir uno cualquiera de los parámetros de eliminación (CL) en plasma, área bajo la curva de concentración (ABC), tiempo de retención medio en plasma y semivida en plasma ($t_{1/2}$);

[12] un polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo cuya farmacocinética en plasma está controlada, que se obtiene por el método de [10];

[13] un método para producir un polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo con un punto isoelectrico modificado, que comprende:

(a) modificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido para modificar la carga de al menos un resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de la región CDR del polipéptido;

(b) cultivar una célula hospedadora para expresar el ácido nucleico; y

(c) recoger el polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo del cultivo de células hospedadoras;

[14] el método de [13], en el que el polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo comprende además un dominio de unión a FcRn;

[15] el método de [13], en el que el polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo es un anticuerpo IgG;

[16] el método de [13], en el que el polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo es un anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado o anticuerpo humano;

[17] el método de [13], en el que el polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo es un polipéptido multiespecífico que se une con al menos dos tipos de antígenos;

[18] el método de [13], en el que la carga de resto de aminoácido se modifica por sustitución de aminoácidos;

[19] el método de [13], en el que la modificación en la carga de resto de aminoácidos da como resultado un cambio de 1,0 o más en el punto isoelectrico teórico;

[20] el método de [13], en el que el resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de la región CDR es al menos un resto de aminoácido seleccionado de restos de aminoácidos en las posiciones 31, 61, 62, 64 y 65 en la región variable de cadena pesada y en las posiciones 24, 27, 53, 54 y 55 en la región variable de cadena ligera de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat;

[21] un polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo con un punto isoelectrico modificado, que se obtiene por el método de uno cualquiera de [13] a [20];

[22] un método para producir un polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo cuya farmacocinética en plasma se controla, que comprende modificar el punto isoelectrico del polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo por el método de uno cualquiera de [13] a [20];

[23] el método de [22], en el que el control de farmacocinética se refiere al aumento o la reducción de uno cualquiera de los parámetros de eliminación (CL) en plasma, área bajo la curva de concentración (ABC), tiempo de retención medio en plasma y semivida en plasma ($t_{1/2}$);

[24] un polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo cuya farmacocinética en plasma está controlada, que se produce por el método de 22;

[25] un método para producir un polipéptido multiespecífico que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido cada uno de los cuales comprende una región variable de anticuerpo, que comprende:

(a) modificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido para modificar la carga de al menos un resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de la región CDR del primer polipéptido y segundo polipéptido, específicamente modificar uno o ambos de un ácido nucleico que codifica los restos de aminoácidos del primer polipéptido y un ácido nucleico que codifica los restos de aminoácidos del segundo polipéptido, para aumentar la diferencia entre los puntos isoelectricos del primer polipéptido y el segundo polipéptido en comparación con antes de la modificación;

(b) cultivar una célula hospedadora para expresar los ácidos nucleicos; y

(c) recoger un anticuerpo multiespecífico del cultivo de células hospedadoras;

[26] el método de [25], en el que la etapa de recoger el polipéptido multiespecífico que comprende el primer polipéptido y segundo polipéptido del cultivo de células hospedadoras se consigue por una cromatografía convencional;

[27] el método de [25], en el que el ácido nucleico se modifica para que los picos para homomultímero del primer polipéptido, homomultímero del segundo polipéptido y heteromultímero del primer polipéptido y el segundo polipéptido estén más claramente separados en un análisis cromatográfico convencional en comparación con los de antes de la modificación;

[28] el método de [25], en el que el polipéptido multiespecífico es un anticuerpo multiespecífico;

[29] un anticuerpo multiespecífico que se produce por el método de [27];

[30] el anticuerpo multiespecífico de [29], que es un anticuerpo biespecífico;

[31] un anticuerpo cuyo punto isoelectrico está modificado en comparación con el anticuerpo antes de la modificación conservando al mismo tiempo la actividad de unión a antígeno, que comprende una región marco conservada derivada de ser humano (FR), una región constante humana y una CDR seleccionada del grupo que consiste en CDR derivadas de ser humano, CDR derivadas de animales no humanos y CDR

sintéticas, en el que al menos un resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de la región CDR es diferente en carga del resto de aminoácido en la posición correspondiente en la CDR de tipo silvestre;

[32] el anticuerpo de [31], en el que la región constante humana comprende un dominio Fc humano;

[33] el anticuerpo de [31], cuya farmacocinética en plasma está controlada por la modificación del punto isoelectrico;

[34] un anticuerpo IgG cuyo punto isoelectrico está modificado en comparación con el de antes de la modificación de aminoácidos, en el que la carga de al menos un resto de aminoácido seleccionado de los restos de aminoácidos en las posiciones 31, 61, 62, 64 y 65 en la región variable de cadena pesada y las posiciones 24, 27, 53, 54 y 55 en la región variable de cadena ligera de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat;

[35] el anticuerpo de [34], en el que el aminoácido modificado se selecciona de los restos de aminoácidos en uno de los grupos (a) y (b) a continuación:

(a) ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D); y

(b) lisina (K), arginina (R) e histidina (H);

[36] un anticuerpo multiespecífico que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, cuyos puntos isoelectricos son diferentes entre sí, y al menos un resto de aminoácido de primer polipéptido seleccionado de los restos de aminoácidos en las posiciones 31, 61, 62, 64 y 65 en la región variable de cadena pesada y en las posiciones 24, 27, 53, 54 y 55 en la región variable de cadena ligera de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat tiene carga;

[37] el anticuerpo de [36], en el que al menos un resto de aminoácido del segundo polipéptido seleccionado de restos de aminoácidos en las posiciones 31, 61, 62, 64 y 65 en la región variable de cadena pesada y en las posiciones 24, 27, 53, 54 y 55 en la región variable de cadena ligera de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat no tiene carga o tiene una carga opuesta a la carga del resto de aminoácido seleccionado del primer polipéptido;

[38] el anticuerpo de [36], en el que el resto de aminoácido que tiene una carga y el resto de aminoácido que tiene una carga opuesta como combinación se seleccionan cada uno del grupo diferente de:

(a) ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D); y

(b) lisina (K), arginina (R) e histidina (H);

[39] el anticuerpo multiespecífico que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido de [36], que proporciona picos separados para el homomultímero del primer polipéptido y el homomultímero del segundo polipéptido en un análisis cromatográfico convencional;

[40] una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y el anticuerpo de uno cualquiera de [31] a [39];

[41] un ácido nucleico que codifica un polipéptido que constituye el anticuerpo de uno cualquiera de [31] a [39];

[42] una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de [41];

[43] un método para producir el anticuerpo de uno cualquiera de [31] a [39], que comprende las etapas de cultivar la célula hospedadora de [42] y recoger el polipéptido del cultivo celular; y

[44] un método para sustituir un resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de la región determinante de complementariedad (CDR) de un polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo conservando al mismo tiempo la actividad de unión a antígeno del polipéptido, que comprende sustituir al menos un resto de aminoácido seleccionado de los restos de aminoácidos en las posiciones 31, 61, 62, 64 y 65 en la región variable de cadena pesada y en las posiciones 24, 27, 53, 54 y 55 en la región variable de cadena ligera de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.

La presente divulgación también proporciona:

[1] un método para producir un anticuerpo de glipicano 3 con farmacocinética en sangre controlada, que comprende las etapas de:

(a) modificar un ácido nucleico que codifica al menos un resto de aminoácido para modificar la carga de al menos un resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie del anticuerpo de glipicano 3;

(b) cultivar una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico para expresar el ácido nucleico; y

(c) recoger el anticuerpo de glipicano 3 del cultivo de células hospedadoras;

[2] el método de [1], en el que el control de farmacocinética en sangre se refiere a un aumento o una reducción de uno cualquiera de los parámetros de semivida en sangre, tiempo de conservación medio en sangre y eliminación en sangre;

[3] el método de [1], en el que la carga del resto de aminoácido se modifica por sustitución de aminoácidos en la etapa (a);

[4] el método de [1], en el que el resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie del anticuerpo de glipicano 3 se localiza en una región distinta del dominio de unión a FcRn del anticuerpo de glipicano 3;

[5] el método de [4], en el que el dominio de unión a FcRn comprende un dominio Fc;
 [6] el método de [1], en el que el anticuerpo de glipicano 3 es un anticuerpo IgG;
 [7] el método de [6], en el que el resto de aminoácido cuya carga va a modificarse es un resto de aminoácido en la región variable de cadena pesada o región variable de cadena ligera del anticuerpo IgG;
 5 [8] el método de [7], en el que el anticuerpo de glipicano 3 es un anticuerpo de glipicano 3 que comprende una región determinante de complementariedad (CDR), región marco conservada (FR) derivada de ser humano y región constante humana, y en el que la modificación de carga del resto de aminoácido en la etapa (a) es modificación de al menos un resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de CDR o FR del anticuerpo para modificar a un resto de aminoácido que tiene una carga diferente;
 10 [9] el método de [8], en el que el anticuerpo de glipicano 3 es un anticuerpo con contenido reducido de fucosa unida a su dominio Fc;
 [10] un anticuerpo de glipicano 3, que se produce por el método de uno cualquiera de [1] a [9];
 [11] un método para estabilizar un anticuerpo de glipicano 3 que comprende una región determinante de complementariedad (CDR), región marco conservada (FR) derivada de ser humano y región constante humana, que comprende modificar al menos un resto de aminoácido que constituye el anticuerpo de glipicano 3 para aumentar el valor de T_m, y que comprende las etapas de:

- (a) modificar un ácido nucleico que codifica al menos un resto de aminoácido para aumentar el valor de T_m del anticuerpo de glipicano 3 para modificar;
- 20 (b) cultivar una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico para expresar el ácido nucleico; y
- (c) recoger el anticuerpo del cultivo de células hospedadoras;

[12] el método de [11], en el que el resto de aminoácido en la etapa (a) se localiza dentro de la región FR1 y/o FR2 de cadena pesada o ligera;
 25 [13] el método de [12], en el que el resto de aminoácido de la región FR2 de cadena pesada de [12] se sustituye con un resto de aminoácido de una región FR2 de la subclase VH4;
 [14] el método de [12], en el que el resto de aminoácido de la región FR2 de cadena ligera de [12] se sustituye con un resto de aminoácido de una región FR2 de la subclase VK3;
 [15] un método para controlar la citotoxicidad de un anticuerpo, que comprende las etapas de;

- (a) modificar un ácido nucleico que codifica al menos un aminoácido para modificar la carga de al menos un aminoácido que puede exponerse en la superficie de un anticuerpo que tiene citotoxicidad;
- (b) cultivar una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico para expresar el ácido nucleico; y
- 35 (c) recoger el anticuerpo del cultivo de células hospedadoras;

[16] el método de [15], en el que el control de la farmacocinética en sangre se refiere al control de uno cualquiera de los parámetros de semivida en sangre, tiempo de retención medio en sangre y eliminación en sangre;
 [17] el método de [15], en el que la carga del resto de aminoácido se modifica por sustitución de aminoácidos en la etapa (a);
 40 [18] el método de [15], en el que el resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie del anticuerpo se localiza en una región distinta del dominio de unión a FcRn del anticuerpo;
 [19] el método de [18], en el que el dominio de unión a FcRn comprende un dominio Fc;
 [20] el método de [15], en el que el anticuerpo de glipicano 3 es un anticuerpo IgG;
 [21] el método de [20], en el que el resto de aminoácido cuya carga va a modificarse es un resto de aminoácido en la región variable de cadena pesada o región variable de cadena ligera del anticuerpo IgG;
 45 [22] el método de [21], en el que el anticuerpo comprende una región determinante de complementariedad (CDR) derivada de un animal no humano, región marco conservada (FR) derivada de ser humano y región constante humana, y en el que la modificación de carga del resto de aminoácido en la etapa (a) es modificación de al menos un resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de CDR o FR del anticuerpo para modificar a un resto de aminoácido que tiene una carga diferente;
 50 [23] el método de [22], en el que el anticuerpo es un anticuerpo con contenido reducido de fucosa unido a su dominio Fc;
 [24] un anticuerpo que se produce por el método de uno cualquiera de [15] a [23];
 [25] el método de [24], en el que el anticuerpo es un anticuerpo de glipicano 3;
 55 [26] un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende uno o más de:

- (a) sustitución de K por T en la posición de aminoácido 19;
- (b) sustitución de Q por E en la posición de aminoácido 43;
- (c) sustitución de K por S en la posición de aminoácido 63;
- 60 (d) sustitución de K por Q en la posición de aminoácido 65; y
- (e) sustitución de G por D en la posición de aminoácido 66;
- en la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 195; y
- una región variable de cadena ligera que comprende una o más de:
- (f) sustitución de Q por E en la posición de aminoácido 27;
- (g) sustitución de K por T en la posición de aminoácido 79; y

(h) sustitución de R por S en la posición de aminoácido 82;

en la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 201;

[27] el anticuerpo de [26], que comprende la cadena pesada de SEQ ID NO: 197 y la cadena ligera de SEQ ID NO: 203;

[28] el anticuerpo de [26], que comprende la cadena pesada de SEQ ID NO: 198 y la cadena ligera de SEQ ID NO: 204;

[29] un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una o más de:

(a) sustitución de Q por K en la posición de aminoácido 43;

(b) sustitución de D por N en la posición de aminoácido 52; y

(c) sustitución de Q por R en la posición de aminoácido 107;

en la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 195; y

una región variable de cadena ligera que comprende uno o más de:

(d) sustitución de E por Q en la posición de aminoácido 17;

(e) sustitución de Q por R en la posición de aminoácido 27; y

(f) sustitución de Q por R en la posición de aminoácido 105;

en la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 201;

[30] el anticuerpo de [29], que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 198 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 204;

[31] el anticuerpo de [29], que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 199 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 205;

[32] el anticuerpo de uno cualquiera de [26] a [31], que comprende una región constante de anticuerpo humano;

[33] una composición que comprende el anticuerpo de [32] y un vehículo farmacéuticamente aceptable;

[34] un agente terapéutico para cáncer, que comprende un anticuerpo de [32] como un principio activo;

[35] el agente terapéutico para cáncer de [34], en el que el cáncer es cáncer de hígado;

[36] un ácido nucleico que codifica un polipéptido que constituye el anticuerpo de uno cualquiera de [26] a [31];

[37] una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de [36]; y

[38] un método para producir el anticuerpo de uno cualquiera de [26] a [31], que comprende las etapas de cultivar la célula hospedadora de [37] y recoger el polipéptido del cultivo celular.

Además, la presente divulgación proporciona:

[1] un anticuerpo anti receptor de IL-6 de uno cualquiera de:

(a) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 en el que Ser en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 se ha sustituido con otro aminoácido;

(b) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 en el que Trp en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 se ha sustituido con otro aminoácido;

(c) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR2 en el que Tyr en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se ha sustituido con otro aminoácido;

(d) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR2 en el que Thr en la posición 8 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se ha sustituido con otro aminoácido;

(e) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR2 en el que Thr en la posición 9 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se ha sustituido con otro aminoácido;

(f) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR3 en el que Ser en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 se ha sustituido con otro aminoácido;

(g) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR3 en el que Leu en la posición 2 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 se ha sustituido con otro aminoácido;

(h) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR3 en el que Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 se ha sustituido con otro aminoácido;

(i) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR3 en el que Ala en la posición 7 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 se ha sustituido con otro aminoácido;

(j) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR3 en el que Met en la posición 8 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 se ha sustituido con otro aminoácido;

(k) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR3 en el que Ser en la posición 1 y Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 se han sustituido con otros aminoácidos;

(l) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR3 en la que Leu en la posición 2, Ala en la posición 7 y Met en la posición 8 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 se han sustituido con otros aminoácidos;

(m) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 en la que Arg

en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (n) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 en la que Gln en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (o) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 en la que Tyr en la posición 9 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (p) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 en la que Asn en la posición 11 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (q) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR2 en la que Thr en la posición 2 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (r) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR3 en la que Gln en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (s) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR3 en la que Gly en la posición 3 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (t) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 en la que Tyr en la posición 9 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 se ha sustituido con otro aminoácido, y CDR3 en la que Gly en la posición 3 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (u) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR3 en la que Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (v) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR3 en la que Gln en la posición 1 y Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 se han sustituido con otros aminoácidos;
 (w) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR2 en la que Thr en la posición 9 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se ha sustituido con otro aminoácido, y CDR3 en la que Ser en la posición 1 y Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 se ha sustituido con otros aminoácidos;
 (x) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada de (k) y la región variable de cadena ligera de (v); y
 (y) el anticuerpo de (x) que comprende además la CDR2 de (e);

[2] un anticuerpo anti receptor de IL-6 que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR2 en la que Thr en la posición 2 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 se ha sustituido con otro aminoácido;

[3] un anticuerpo anti receptor de IL-6 de uno cualquiera de:

(a) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR1 en la que Arg en la posición 13 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (b) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR1 en la que Gln en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (c) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR1 en la que Thr en la posición 23 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (d) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR1 en la que Thr en la posición 30 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (e) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR1 en la que Arg en la posición 13, Gln en la posición 16, Thr en la posición 23 y Thr en la posición 30 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 se han sustituido con otros aminoácidos;
 (f) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR2 en la que Arg en la posición 8 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (g) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR3 en la que Met en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (h) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR3 en la que Leu en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (i) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR3 en la que Arg en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (j) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR3 en la que Val en la posición 27 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (k) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR3 en la que Met en la posición 4, Leu en la posición 5, Arg en la posición 16 y Val en la posición 27 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 se han sustituido con otros aminoácidos;
 (l) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR4 en la que Gln en la posición 3 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (m) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende FR1 en la que Arg en la posición 18 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (n) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende FR2 en la que Lys en la posición 11 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (o) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende FR3 en la que Gln en

la posición 23 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (p) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende FR3 en la que Pro en la posición 24 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (q) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende FR3 en la que Ile en la posición 27 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (r) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende FR3 en la que Gln en la posición 23, Pro en la posición 24 e Ile en la posición 27 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 se han sustituido con otros aminoácidos;
 (s) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende FR4 en la que Lys en la posición 10 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (t) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR4 en la que Ser en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (u) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR4 en la que Gln en la posición 3 y Ser en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 se han sustituido con otros aminoácidos;
 (v) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 184;
 (w) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la FR1 de (e), FR2 de (f), FR3 de (k) y FR4 de (1) o (u);
 (x) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la FR1 de (m), FR2 de (n), FR3 de (r) y FR4 de (s); y
 (y) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada de (w) y la región variable de cadena ligera de (x);

[4] un anticuerpo anti receptor de IL-6 de uno cualquiera de:

(a) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 en la que Ser en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (b) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR2 en la que Thr en la posición 9 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (c) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR2 en la que Ser en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (d) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR2 en la que Thr en la posición 9 y Ser en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se han sustituido con otros aminoácidos;
 (e) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 en la que Arg en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (f) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR2 en la que Thr en la posición 2 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (g) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR2 en la que Arg en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (h) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR2 en la que Thr en la posición 2 y Arg en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 se han sustituido con otros aminoácidos;
 (i) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR3 en la que Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 se ha sustituido con otro aminoácido;
 (j) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la CDR1 de (a), CDR2 de (d) y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3;
 (k) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la CDR1 de (e), CDR2 de (h) y CDR3 de (i); y
 (l) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada de (j) y la región variable de cadena ligera de (k);

[5] un anticuerpo anti receptor de IL-6 de uno cualquiera de:

(a) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 en la que Ser en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 se ha sustituido con otro aminoácido, CDR2 en la que Thr en la posición 9 y Ser en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se han sustituido con otros aminoácidos y CDR3 en la que Ser en la posición 1 y Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 se han sustituido con otros aminoácidos;
 (b) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 en la que Arg en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 se ha sustituido con otro aminoácido, CDR2 en la que Thr en la posición 2 y Arg en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 se han sustituido con otros aminoácidos, y CDR3 en la que Gln en la posición 1 y Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 se han sustituido con otros aminoácidos;
 (c) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 22;

(d) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23;

(e) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada de (a) y la región variable de cadena ligera de (b); y

(f) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada de (c) y la región variable de cadena ligera de (d);

[6] una región constante de anticuerpo humano de una cualquiera de:

(a) una región constante de anticuerpo humano que comprende supresiones tanto de Gly en la posición 329 (446 en el sistema de numeración de EU) como de Lys en la posición 330 (447 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19;

(b) una región constante de anticuerpo humano que comprende supresiones tanto de Gly en la posición 325 (446 en el sistema de numeración de EU) como de Lys en la posición 326 (447 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; y

(c) una región constante de anticuerpo humano que comprende supresiones tanto de Gly en la posición 326 (446 en el sistema de numeración de EU) como de Lys en la posición 327 (447 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;

[7] una región constante de IgG2 en la que los aminoácidos en las posiciones 209 (330 en el sistema de numeración de EU), 210 (331 en el sistema de numeración de EU) y 218 (339 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 se han sustituido con otros aminoácidos;

[8] una región constante de IgG2 en la que el aminoácido en la posición 276 (397 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 se ha sustituido con otro aminoácido;

[9] una región constante de IgG2 en la que el aminoácido en la posición 14 (131 en el sistema de numeración de EU), 102 (219 en el sistema de numeración de EU) y/o 16 (133 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 se ha sustituido con otro aminoácido;

[10] la región constante de IgG2 de [9], en la que los aminoácidos en las posiciones 20 (137 en el sistema de numeración de EU) y 21 (138 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 se han sustituido con otros aminoácidos;

[11] una región constante de IgG2 en la que His en la posición 147 (268 en el sistema de numeración de EU), Arg en la posición 234 (355 en el sistema de numeración de EU) y/o Gln en la posición 298 (419 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 se ha sustituido con otro aminoácido;

[12] una región constante de IgG2 en la que los aminoácidos en las posiciones 209 (330 en el sistema de numeración de EU), 210 (331 en el sistema de numeración de EU), 218 (339 en el sistema de numeración de EU), 276 (397 en el sistema de numeración de EU), 14 (131 en el sistema de numeración de EU), 16 (133 en el sistema de numeración de EU), 102 (219 en el sistema de numeración de EU), 20 (137 en el sistema de numeración de EU) y 21 (138 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 se han sustituido con otros aminoácidos;

[13] la región constante de IgG2 de [12], que comprende además supresiones tanto de Gly en la posición 325 (446 en el sistema de numeración de EU) como de Lys en la posición 326 (447 en el sistema de numeración de EU);

[14] una región constante de IgG2 en la que los aminoácidos en las posiciones 276 (397 en el sistema de numeración de EU), 14 (131 en el sistema de numeración de EU), 16 (133 en el sistema de numeración de EU), 102 (219 en el sistema de numeración de EU), 20 (137 en el sistema de numeración de EU) y 21 (138 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 se han sustituidos con otros aminoácidos;

[15] la región constante de IgG2 de [14], que comprende además supresiones tanto de Gly en la posición 325 (446 en el sistema de numeración de EU) como de Lys en la posición 326 (447 en el sistema de numeración de EU);

[16] una región constante de IgG2 en la que la Cys en la posición 14 (131 en el sistema de numeración de EU), Arg en la posición 16 (133 en el sistema de numeración de EU), Cys en la posición 102 (219 en el sistema de numeración de EU), Glu en la posición 20 (137 en el sistema de numeración de EU), Ser en la posición 21 (138 en el sistema de numeración de EU), His en la posición 147 (268 en el sistema de numeración de EU), Arg en la posición 234 (355 en el sistema de numeración de EU) y Gln en la posición 298 (419 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 se han sustituido con otros aminoácidos;

[17] la región constante de IgG2 de [16], que comprende además supresiones tanto de Gly en la posición 325 (446 en el sistema de numeración de EU) como de Lys en la posición 326 (447 en el sistema de numeración de EU);

[18] una región constante de IgG2 en la que la Cys en la posición 14 (131 en el sistema de numeración de EU), Arg en la posición 16 (133 en el sistema de numeración de EU), Cys en la posición 102 (219 en el sistema de numeración de EU), Glu en la posición 20 (137 en el sistema de numeración de EU), Ser en la posición 21 (138 en el sistema de numeración de EU), His en la posición 147 (268 en el sistema de numeración de EU), Arg en la posición 234 (355 en el sistema de numeración de EU), Gln en la posición 298 (419 en el sistema de numeración de EU) y Asn en la posición 313 (434 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO: 20 se han sustituido con otros aminoácidos;

[19] la región constante de IgG2 de [18], que comprende además supresiones tanto de Gly en la posición 325 (446 en el sistema de numeración de EU) como de Lys en la posición 326 (447 en el sistema de numeración de EU);

[20] una región constante de IgG4 en la que el aminoácido en la posición 289 (409 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 se ha sustituido con otro aminoácido;

[21] una región constante de IgG4 en la que los aminoácidos en la posición 289 (409 en el sistema de numeración de EU), posiciones 14, 16, 20, 21, 97, 100, 102, 103, 104 y 105 (131, 133, 137, 138, 214, 217, 219, 220, 221 y 222 en el sistema de numeración de EU, respectivamente) y las posiciones 113, 114 y 115 (233, 234 y 235 en el sistema de numeración de EU, respectivamente) se han sustituido con otros aminoácidos, y el aminoácido en la posición 116 (236 en el sistema de numeración de EU) se ha suprimido de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;

[22] la región constante de IgG4 de [21], que comprende además supresiones tanto de Gly en la posición 326 (446 en el sistema de numeración de EU) como de Lys en la posición 327 (447 en el sistema de numeración de EU);

[23] una región constante de IgG2 en la que Ala en la posición 209 (330 en el sistema de numeración de EU), Pro en la posición 210 (331 en el sistema de numeración de EU), Thr en la posición 218 (339 en el sistema de numeración de EU), Cys en posición 14 (131 en el sistema de numeración de EU), Arg en la posición 16 (133 en el sistema de numeración de EU), Cys en la posición 102 (219 en el sistema de numeración de EU), Glu en la posición 20 (137 en el sistema de numeración de EU) y Ser en la posición 21 (138 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 se han sustituido con otros aminoácidos;

[24] la región constante de IgG2 de [23], que comprende además supresiones tanto de Gly en la posición 325 (446 en el sistema de numeración de EU) como de Lys en la posición 326 (447 en el sistema de numeración de EU);

[25] una región constante de IgG2 en la que Cys en la posición 14 (131 en el sistema de numeración de EU), Arg en la posición 16 (133 en el sistema de numeración de EU), Cys en la posición 102 (219 en el sistema de numeración de EU), Glu en la posición 20 (137 en el sistema de numeración de EU) y Ser en la posición 21 (138 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 se han sustituido con otros aminoácidos;

[26] la región constante de IgG2 de [25], que comprende además supresiones tanto de Gly en la posición 325 (446 en el sistema de numeración de EU) como de Lys en la posición 326 (447 en el sistema de numeración de EU);

[27] una región constante que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24;

[28] una región constante que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118;

[29] una región constante que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25;

[30] una región constante que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151;

[31] una región constante que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 152;

[32] una región constante que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153;

[33] una región constante que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 164;

[34] una región constante de anticuerpo humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 194 (M40ΔGK);

[35] una región constante de anticuerpo humano que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 192 (M86ΔGK);

[36] un anticuerpo que comprende la región constante de uno cualquiera de [6] a [36];

[37] el anticuerpo de [36], que se une a un receptor de IL-6;

[38] un anticuerpo anti receptor de IL-6 cuya actividad de unión con un receptor de IL-6 es 1 nM o menor;

[39] un anticuerpo anti receptor de IL-6, en el que el punto isoeléctrico medido del anticuerpo de longitud completa es 7,0 o menor o el punto isoeléctrico teórico de la región variable es 5,0 o menor;

[40] un anticuerpo anti receptor de IL-6, en el que el aumento de la relación de agregado de anticuerpo después de un mes a 25 °C en un tampón que contiene histidina-HCl 20 mM y NaCl 150 mM a pH 6,5 hasta 7,0 es 0,3 % o menos cuando la concentración del anticuerpo es 100 mg/ml; y

[41] una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de uno cualquiera de [36] a [40].

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una gráfica que muestra las actividades neutralizantes de BaF/gp130 de WT y RD_6.

La Figura 2 es una gráfica que muestra un sensograma para la interacción entre rhIL-s6R (R&D systems) y WT.

La Figura 3 es una gráfica que muestra un sensograma para la interacción entre rhIL-s6R (R&D systems) y RD_6.

La Figura 4-1 es un diagrama que muestra una lista de mutaciones de CDR que mejoran la afinidad o actividad neutralizante en comparación con WT.

La Figura 4-2 es la continuación de la Figura 4-1.

La Figura 5 es un diagrama que muestra una lista de mutaciones de CDR que en combinación mejoran la afinidad o actividad neutralizante.

La Figura 6 es una gráfica que muestra las actividades neutralizantes de BaF/gp130 de WT y RDC23.

La Figura 7 es una gráfica que muestra un sensograma para la interacción entre rhIL-s6R (R&D systems) y

RDC23.

La Figura 8 es una gráfica que muestra un sensograma para la interacción entre rhsIL-6R y WT.

La Figura 9 es una gráfica que muestra un sensograma para la interacción entre rhsIL-6R y RDC23.

La Figura 10 es una gráfica que muestra un sensograma para la interacción entre SR344 y WT.

La Figura 11 es una gráfica que muestra un sensograma para la interacción entre SR344 y RDC23.

La Figura 12 es una gráfica que muestra las actividades neutralizantes de BaF/gp130 de WT y H53L28.

La Figura 13 es una gráfica que muestra un sensograma para la interacción entre SR344 y H53/L28.

La Figura 14 es una gráfica que muestra transiciones en las concentraciones en plasma de WT y H53/L28 después de administración intravenosa a ratones.

La Figura 15 es una gráfica que muestra transiciones en las concentraciones en plasma de WT y H53/L28 después de administración subcutánea a ratones.

La Figura 16 es una gráfica que muestra las actividades neutralizantes de BaF/gp130 de WT y PF1.

La Figura 17 es una gráfica que muestra un sensograma para la interacción entre SR344 y PF1.

La Figura 18 es una gráfica que muestra el resultado de ensayo de la estabilidad de WT y PF1 a altas concentraciones.

La Figura 19 es una gráfica que muestra transiciones en las concentraciones en plasma de WT y PF1 después de administración intravenosa a ratones transgénicos para el receptor IL-6 humano.

La Figura 20 es una gráfica que muestra transiciones en las concentraciones en plasma de receptor de IL-6 soluble humano libre después de administración intravenosa de WT o PF1 a ratones transgénicos para el receptor de IL-6 humano.

La Figura 21 es una gráfica que muestra el resultado del uso de cromatografía de filtración en gel para analizar el contenido de agregados en WT-IgG1 WT-IgG2, WT-IgG4, IgG2-M397V y IgG4-R409K purificados por elución con ácido clorhídrico.

La Figura 22 es un diagrama que muestra el resultado de análisis de cromatografía de intercambio catiónico (IEC) de WT-IgG1, WT-IgG2 y WT-IgG4.

La Figura 23 es un diagrama que muestra enlaces disulfuro predichos en la región bisagra de WT-IgG2.

La Figura 24 es un diagrama que muestra enlaces disulfuro predichos en la región bisagra de WT-IgG2-SKSC.

La Figura 25 es un diagrama que muestra el resultado de análisis de cromatografía de intercambio catiónico (IEC) de WT-IgG2 e IgG2- SKSC.

La Figura 26 es un diagrama que muestra el resultado de análisis de cromatografía de intercambio catiónico (IEC) de anticuerpo PM-1 humanizado, anticuerpo Δ K C terminal de cadena pesada y anticuerpo Δ GK C terminal de cadena pesada.

La Figura 27 muestra comparaciones de las cantidades de WT-IgG1, WT-IgG2, WT-IgG4, WT-M14 Δ GK, WT-M17 Δ GK y WT- M11 Δ GK unidos a FcyRI.

La Figura 28 es una gráfica que muestra comparaciones de las cantidades de WT-IgG1, WT-IgG2, WT-IgG4, WT-M14 Δ GK, WT-M17 Δ GK y WT-M11 Δ GK unidos a FcyRIIa.

La Figura 29 es una gráfica que muestra comparaciones de las cantidades de WT-IgG1, WT-IgG2, WT-IgG4, WT-M14 Δ GK, WT-M17 Δ GK y WT-M11 Δ GK unidos a FcyRIIb.

La Figura 30 es una gráfica que muestra comparaciones de las cantidades de WT-IgG1, WT-IgG2, WT-IgG4, WT-M14 Δ GK, WT-M17 Δ GK y WT-M11 Δ GK unidos a FcyRIIa (Val).

La Figura 31 es una gráfica que muestra el aumento de agregación en un ensayo de estabilidad para WT-IgG1, WT-M14 Δ GK, WT-M17 Δ GK y WT-M11 Δ GK a altas concentraciones.

La Figura 32 es una gráfica que muestra el aumento de fragmentos Fab en un ensayo de estabilidad para WT-IgG1, WT-M14 Δ GK, WT-M17 Δ GK y WT-M11 Δ GK a altas concentraciones.

La Figura 33 es un diagrama que muestra el resultado del análisis de cromatografía de intercambio catiónico (IEC) de WT-IgG2, WT-M14 Δ GK y WT-M31 Δ GK.

La Figura 34 es una gráfica que muestra las actividades neutralizantes de BaF/gp130 de WT y F2H/L39-IgG1.

La Figura 35 es una gráfica que muestra los ciclos temporales de concentración en plasma de anticuerpos después de administración subcutánea de WT, PF1 o F2H/L39-IgG1 a 1,0 mg/kg a monos cinomolgus.

La Figura 36 es una gráfica que muestra los ciclos temporales de concentración de CRP en los grupos de monos cinomolgus a los que se ha administrado WT o F2H/L39-IgG1.

La Figura 37 es una gráfica que muestra los ciclos temporales de la concentración de receptor de IL-6 de mono cinomolgus libre en los grupos de monos cinomolgus a los que se administró WT o F2H/L39-IgG1.

La Figura 38 es una gráfica que muestra los ciclos temporales de concentraciones en plasma de WT-IgG1 y WT-M14 después de administración intravenosa a ratones transgénicos para FcRn humano.

La Figura 39 es una gráfica que muestra los ciclos temporales de concentraciones en plasma de WT-IgG1, WT-M14 y WT-M58 después de administración intravenosa a ratones transgénicos para FcRn humano.

La Figura 40 es una gráfica que muestra los ciclos temporales de concentraciones en plasma de WT-IgG1, WT-M44, WT-M58 y WT-M73 después de administración intravenosa a ratones transgénicos para FcRn humano.

La Figura 41 es un diagrama que muestra una evaluación basada en cromatografía de intercambio catiónico del efecto sobre la heterogeneidad por la región constante de anticuerpos anti receptor de IL-6 WT y F2H/L39, anticuerpo anti receptor de IL-31 H0L0 y anticuerpo anti RANKL DNS.

La Figura 42 es un diagrama que muestra una evaluación basada en cromatografía de intercambio catiónico del efecto sobre la heterogeneidad por la cisteína de dominio CH1 de anticuerpos anti receptor de IL-6 WT y F2H/L39.

La Figura 43 es un diagrama que muestra una evaluación basada en DSC del efecto sobre el pico de

desnaturalización por la cisteína de dominio CH1 de anticuerpo anti receptor de IL-6 WT.

La Figura 44 es una gráfica que muestra las actividades de TOCILIZUMAB, el control y Fv5-M83 para neutralizar BaF/g130.

La Figura 45 es una gráfica que muestra las actividades de TOCILIZUMAB, Fv3-M73 y Fv4-M73 para neutralizar BaF/gp130.

La Figura 46 es una gráfica que muestra los ciclos temporales de concentración en plasma de TOCILIZUMAB, el control, Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 en monos cinomolgus después de administración intravenosa.

La Figura 47 es una gráfica que muestra los ciclos temporales de concentración de CRP en monos cinomolgus después de administración intravenosa de TOCILIZUMAB, el control, Fv3-M73, Fv4-M73 o Fv5-M83.

La Figura 48 es una gráfica que muestra los ciclos temporales de porcentaje de neutralización del receptor de IL-6 soluble en monos cinomolgus después de administración intravenosa de TOCILIZUMAB, el control, Fv3-M73, Fv4-M73 o Fv5-M83.

La Figura 49 es una gráfica obtenida por medición de DSC del anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2).

La Figura 50 es una imagen electroforética de los anticuerpos H0L0 y Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2) por isoelectroenfoque de alto pl.

La Figura 51 es una imagen electroforética de los anticuerpos H0L0 y Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) por isoelectroenfoque de bajo pl.

La Figura 52 es una gráfica que muestra las actividades de unión a glipicano 3 (antígeno) de los anticuerpos H15L4 y H0L0 determinadas por ELISA competitivo.

La Figura 53 es una gráfica que muestra las actividades de unión a glipicano 3 (antígeno) de los anticuerpos Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2) y H0L0 determinadas por ELISA competitivo.

La Figura 54 es una gráfica que muestra las actividades de unión a glipicano 3 (antígeno) de los anticuerpos Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) y H0L0 determinadas por ELISA competitivo.

La Figura 55 muestra los efectos antitumorales de los anticuerpos H0L0, Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2) y Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) en el modelo de ratón con injerto de hepatocarcinoma humano.

La Figura 56 muestra las concentraciones en plasma de los anticuerpos H0L0, Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2) y Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) en los ratones modelo con injerto de hepatocarcinoma humano.

La Figura 57 muestra ADCC de cada anticuerpo de ensayo contra células de la línea de hepatocarcinoma humano Hep G2.

La Figura 58 es una gráfica que muestra las actividades neutralizantes del receptor de IL-6 6R_b_H1L1, 6R_b_H2L2, 6R_b_H2L3 y 6R_b_H2L4 in BaF/6R.

La Figura 59 es una gráfica que muestra las actividades de unión a glipicano 3 (antígeno) de los anticuerpos GPC_H1L1 y GPC_H2L2 determinadas por ELISA competitivo.

La Figura 60 es una gráfica que muestra las actividades de unión a glipicano 3 (antígeno) de los anticuerpos GPC_H2L2 y GPC_H3L3 determinadas por ELISA competitivo.

La Figura 61 es un diagrama que muestra la separación de picos para heterodímero de cadena A-cadena B, homodímero de cadena A y homodímero de cadena B en cromatografía de intercambio catiónico de 6R_a_H1H3L3, GPC3_H2H3L3 y 31R_H1aH2aL2.

Modo de llevar a cabo la invención

La presente invención proporciona métodos para modificar el punto isoeléctrico de un polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo conservando al mismo tiempo la actividad de unión a antígeno de la región variable, que comprende modificar la carga de al menos un resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de CDR del polipéptido. La presente divulgación también proporciona polipéptidos que comprenden una región variable de anticuerpo con un punto isoeléctrico modificado obtenido por los métodos anteriores; por ejemplo, anticuerpos que comprenden una región marco conservada (FR) derivada de ser humano, región constante humana y CDR seleccionada del grupo que consiste en CDR derivadas de ser humano, CDR derivadas de animal no humano y CDR sintéticas, en las que al menos un resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de CDR es un resto de aminoácido que tiene una carga diferente de la del resto de aminoácido en la posición correspondiente en la CDR de tipo silvestre, y tiene un punto isoeléctrico modificado en comparación con antes de la modificación conservando al mismo tiempo su actividad de unión a antígeno.

En una realización preferida, los métodos de la presente invención comprenden modificar la carga de al menos un resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie del anticuerpo. Específicamente, la farmacocinética de un anticuerpo en plasma (farmacocinética en sangre) puede controlarse modificando las cargas de restos de aminoácidos en el anticuerpo para cambiar el punto isoeléctrico del anticuerpo. Como resultado de la modificación, por ejemplo, el anticuerpo con farmacocinética en plasma controlada puede ejercer actividad antitumoral contra células cancerosas superior a la del anticuerpo original.

En los métodos de la presente invención, "conservando la actividad de unión a antígeno" significa teniendo al menos 80 % o más, preferentemente 85 % o más, y más preferentemente 90 % o más de la actividad de unión del péptido antes de la modificación. Siempre que pueda conservarse suficiente actividad de unión para unión con el antígeno para que el anticuerpo ejerza su función, la afinidad determinada a 37 °C en condiciones fisiológicas puede ser, por ejemplo, 100 nM o menos, preferentemente 50 nM o menos, más preferentemente 10 nM o menos, y aún más preferentemente 1 nM o menos. Si un polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo con un punto

isoelectrico modificado obtenido por los métodos de la presente invención conserva la actividad de unión a antígeno puede ensayarse por métodos conocidos tales como Biacore (análisis de interacción intermolecular), ensayo de proliferación celular, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), EIA (inmunoensayo enzimático), RIA (radioinmunoensayo) e inmunoensayo de fluorescencia.

"Polipéptido de la presente invención que comprende una región variable de anticuerpo" incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, anticuerpos, minicuerpos (anticuerpos de bajo peso molecular) y proteínas de almacén.

Como se desvela, cualquier proteína de almacén es aceptable siempre que sea un péptido que tenga una estructura tridimensional estable y sea capaz de unirse con al menos un antígeno. Dichos péptidos incluyen, por ejemplo, fragmentos de regiones variables de anticuerpo, fibronectina, dominio de proteína A, dominio de receptor de LDL A, lipocalina y otras moléculas descritas en Nygren *et al.* (Current Opinion in Structural Biology, (1997) 7:463-469; Journal of Immunol Methods, (2004) 290:3-28), Binz *et al.* (Nature Biotech. (2005) 23:1257-1266), y Hosse *et al.* (Protein Science, (2006) 15:14-27).

En el presente documento, el término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio, e incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos mutantes (tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, minicuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo) y anticuerpos multiespecíficos) siempre que presenten una actividad biológica deseada. En la presente invención, los métodos de modificación de anticuerpo de la presente invención pueden usarse favorablemente en estos anticuerpos cuando se obtengan (produzcan).

Los "anticuerpos" de la presente invención incluyen anticuerpos en los que la carga de restos de aminoácidos se ha modificado como se ha descrito anteriormente, y cuyas secuencias de aminoácidos se han modificado adicionalmente por sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos. Los "anticuerpos" también incluyen anticuerpos cuyas secuencias de aminoácidos se han modificado por sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos, o quimerización, humanización o similares, y en los que la carga de restos de aminoácidos se ha modificado adicionalmente. Pueden realizarse modificaciones al mismo tiempo cuando se humanizan anticuerpos de ratón, o pueden realizarse modificaciones adicionales en anticuerpos humanizados.

Pueden conseguirse modificaciones de secuencias de aminoácidos, tales como sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos y humanización y quimerización, mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Cuando los anticuerpos de la presente invención se preparan como anticuerpos recombinantes, de forma similar, las secuencias de aminoácidos de las regiones variables y constantes de anticuerpos también pueden modificarse por sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos, o quimerización, humanización y similares.

Los anticuerpos de la presente invención pueden derivar de cualquier animal, tal como un ratón, ser humano, rata, conejo, cabra o camello. Además, los anticuerpos pueden ser 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 modificación de anticuerpos unidos con diversas moléculas, fragmentos de anticuerpo y minicuerpos.

Los "anticuerpos quiméricos" son anticuerpos preparados combinando secuencias derivadas de diferentes animales. Un ejemplo es un anticuerpo que tiene regiones variables de cadena pesada y ligera (V) de un anticuerpo pesado y regiones constantes de cadena pesada y ligera (C) de un anticuerpo humano. Pueden prepararse anticuerpos quiméricos por métodos conocidos. Para obtener dichos anticuerpos quiméricos, por ejemplo, puede ligarse un ADN que codifica una región variable de anticuerpo con un ADN que codifica una región constante de anticuerpo humano; el producto de ligamiento resultante se inserta en un vector de expresión; y la construcción se introduce en un hospedador para producir el anticuerpo quimérico.

Los minicuerpos de la presente divulgación no están particularmente limitados por su estructura ni su método de producción siempre que tengan actividad de unión a antígeno. Algunos minicuerpos tienen una actividad mayor que la de un anticuerpo completo (Orita *et al.*, Blood, (2005) 105:562-566). En el presente documento, los "minicuerpos" no están particularmente limitados, siempre que sean una parte de un anticuerpo completo (por ejemplo, IgG completo). Sin embargo, los minicuerpos incluyen preferentemente una región variable de cadena pesada (VH) o una región variable de cadena ligera (VL). Son ejemplos de fragmentos de anticuerpos preferidos Fab, F(ab')₂, Fab' y Fv. La secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada o región variable de cadena ligera en un fragmento de anticuerpo puede modificarse por sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones. Además, algunas partes de una región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera pueden suprimirse, siempre que los fragmentos resultantes conserven su capacidad de unión a antígeno. Por ejemplo, de los fragmentos de anticuerpo descritos anteriormente, "Fv" es un fragmento de anticuerpo mínimo compuesto de los sitios de reconocimiento y unión a antígeno completos. "Fv" es un dímero (dímero VH-VL) compuesto de una unidad de región variable de cadena pesada y una unidad de región variable de cadena ligera unida muy fuertemente por enlace no covalente. Se forma un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL por las tres CDR de cada región variable. Seis CDR confieren un sitio de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso una región variable (o la mitad de un Fv compuesto de solamente tres CDR específicas de antígeno) tiene la capacidad de

reconocer y unirse con un antígeno, aunque su afinidad es menor que la del sitio de unión completo. Por lo tanto, también se incluyen moléculas menores de Fv en el contexto de minicuerpos de la presente divulgación. Las regiones variables de un minicuerpo también pueden ser quimerizadas o humanizadas.

Los minicuerpos incluyen preferentemente tanto una región variable de cadena pesada como una región variable de cadena ligera. Los ejemplos de minicuerpos adecuados incluyen fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv y scFv (Fv monocatenario), que puede prepararse usando fragmentos de anticuerpo (Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85:5879-83; Pluckthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol. 113, Resenburt y Moore (eds.), Springer Verlag, Nueva York, pp. 269-315, (1994)), diacuerpos (Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:6444-8; documentos EP 404097; WO93/11161; 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 puede prepararse tratando 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, también puede introducirse fragmentos de anticuerpo por recombinación genética basándose en su secuencia de aminoácidos.

Un minicuerpo que tiene una estructura que resulta de la modificación de un fragmento de anticuerpo puede prepararse usando fragmentos de anticuerpo obtenidos por tratamiento enzimático o recombinación genética. Como alternativa, después de construir un gen que codifica un minicuerpo completo, e introducir 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 mediante el enlazador o similares, según se requiera. Las dos regiones variables en un scFv son típicamente una región variable de cadena pesada una región variable de cadena ligera, pero un scFv puede incluir dos regiones variables de cadena pesada o dos regiones variables de cadena ligera. En general, los polipéptidos de scFv incluyen un enlazador entre la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera, formando de este modo una parte emparejada de región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera requerida para unión a antígeno. Un enlazador peptídico compuesto de diez o más aminoácidos se usa típicamente como el enlazador entre región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera cuando se forma una parte emparejada intramolecular entre región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera. Sin embargo, los enlazadores del scFv de la presente invención no se limitan a dichos enlazadores peptídicos, siempre que no inhiba la formación de un scFv. Para revisar scFv, véase Pluckthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibody", Vol. 113 (Rosenburt y Moore ed., Springer Verlag, NY, pp.269-315 (1994)).

El término "diacuerpos" (Dd) se refiere a fragmentos de anticuerpo bivalentes contruidos por fusión génica (P. Holliger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993); documentos EP 404.097; WO93/11161 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 y una región variable de cadena pesada conectada con un enlazador suficientemente corto para deshabilitar la interacción de estas dos regiones, por ejemplo, un enlazador de aproximadamente cinco restos de aminoácidos. La región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada codificadas en la misma cadena polipeptídica formaron un dímero porque el enlazador entre la región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada es demasiado corto para formar un fragmento de región variable monocatenario. Por lo tanto, el diacuerpo resultante tiene dos sitios de unión a antígeno. En el presente documento, cuando se expresan región variable de cadena ligera y región variable de cadena pesada dirigidas contra dos epítomos diferentes (a y b) simultáneamente como combinaciones de VL_a-VH_b y VL_a-VH_b conectadas con un enlazador de aproximadamente cinco restos, se secretan como Db bispecíficos.

Ya que los diacuerpos incluyen dos moléculas de scFv, están compuestos por lo tanto de cuatro regiones variables, y como resultado tienen dos sitios de unión a antígeno. Cuando el objetivo es formar un diacuerpo, a diferencia de en el caso de scFv que no forman dímeros, habitualmente, los enlazadores que forman una conexión entre región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera en cada molécula de scFv son enlazadores de aproximadamente 5 aminoácidos cuando se usan como enlazadores peptídicos. Sin embargo, los enlazadores de scFv para formación de diacuerpos no están limitados a dichos enlazadores peptídicos siempre que no interfieran con la expresión de scFv y formación de diacuerpos.

De los varios isotipos de anticuerpo, el anticuerpo IgG tiene un peso molecular significativamente mayor, y su ruta metabólica principal no es la excreción renal. Se sabe que el anticuerpo IgG, que comprende un dominio Fc como parte de la molécula, se recicla a través de una ruta de recuperación mediante el receptor de Fc fetal (FcRn) expresado en células endoteliales de vasos sanguíneos o similares, y tiene, por lo tanto, una semi-vida *in vivo*

mayor. Se cree que el anticuerpo IgG se metaboliza principalmente mediante una ruta metabólica en células endoteliales (He XY, Xu Z, Melrose J, Mullowney A, Vasquez M, Queen C, Vexler V, Klingbeil C, Co MS, Berg EL. Humanization and pharmacokinetics of a monoclonal antibody with specificity for both E- and P-selectin. *J Immunol.* (1998) 160 (2):1029-35). Específicamente, se cree que cuando se incorpora de forma no específica en células endoteliales, el anticuerpo IgG se recicla mediante unión con FcRn mientras que se metaboliza el anticuerpo IgG libre. La semivida en plasma del anticuerpo IgG se acorta cuando su dominio Fc se ha modificado para reducir su actividad de unión a FcRn. Por el contrario, la semivida en plasma del anticuerpo IgG puede prolongarse modificando restos de aminoácidos que constituyen el dominio Fc para aumentar la actividad de unión a FcRn (*J Immunol.* (1998) 160 (2):1029-35). Como se ha descrito anteriormente, los métodos convencionales para controlar la farmacocinética en plasma de anticuerpo IgG se basan en la modificación de la actividad de unión a FcRn mediante la modificación de restos de aminoácidos que constituyen el dominio Fc. Sin embargo, como se describe en los ejemplos posteriores, la presente invención reveló que la semivida en plasma de un anticuerpo depende de su punto isoelectrónico con una alta correlación. Específicamente, la presente invención demostró que la semivida en plasma del anticuerpo podría controlarse sin modificar la secuencia de aminoácidos que constituye el Fc, cuya modificación potencialmente da como resultado adquisición de inmunogenicidad.

Sin pretender adherirse a una teoría particular, los presentes inventores tienen en la actualidad la siguiente teoría. Se cree que la tasa de captación de anticuerpo IgG no específica por células endoteliales depende de la interacción de Coulomb fisicoquímica entre el anticuerpo IgG y la superficie celular con carga negativa. Por lo tanto, una reducción (aumento) del punto isoelectrónico del anticuerpo IgG reduce (potencia) la interacción de Coulomb, lo que reduce (aumenta) la capacidad no específica por células endoteliales, y como resultado, el metabolismo en células endoteliales se reduce (potencia). Esto permite controlar la farmacocinética en plasma. Ya que la interacción de Coulomb entre células endoteliales y la carga negativa en superficie celular es una interacción fisicoquímica, se cree que la interacción no depende exclusivamente de la secuencia de aminoácidos que constituye el anticuerpo. Por lo tanto, los métodos de la presente invención para controlar la farmacocinética en plasma son aplicables no solamente a anticuerpos específicos sino también a cualquier polipéptido que comprenda una región variable de anticuerpo. Los péptidos preferidos incluyen péptidos con un peso molecular de 50.000 o más, más preferentemente 100.000 o más, y aún más preferentemente 140.000 o más. Ya que la ruta metabólica principal de dichos péptidos no es excreción renal, es ampliamente posible obtener el efecto de control de farmacocinética en plasma en la presente invención. En el presente documento, el deterioro (potenciación) de la interacción de Coulomb significa un aumento (reducción) en la fuerza de Coulomb que es una fuerza repulsiva.

Los polipéptidos desvelados en el presente documento que comprenden el dominio de unión a FcRn no están limitados a anticuerpos IgG. Los polipéptidos pueden ser cualquier proteína siempre que puedan unirse con (tengan la actividad o afinidad de unión con) receptor de Fc (FcRn). Preferentemente, los polipéptidos de la presente invención que comprenden el dominio de unión a FcRn son proteínas que comprenden un dominio Fc de anticuerpo o un dominio de tipo Fc, pero no se limitan a los mismos. El dominio Fc puede ser un dominio Fc modificado, por ejemplo, un dominio Fc descrito en *J Immunol.* (1998) 160 (2):1029-35 citado anteriormente. Los polipéptidos de la presente invención que comprenden el dominio de unión a FcRn incluyen, por ejemplo, anticuerpos IgG. Además, también se incluye en formas modificadas de los anticuerpos (proteínas) en los polipéptidos de la presente invención que comprenden un dominio de unión FcRn, siempre que puedan unirse con FcRn. Los polipéptidos más preferidos de la presente invención que comprenden un dominio de unión a FcRn incluyen, por ejemplo, anticuerpos IgG.

Cuando se usa un anticuerpo IgG como el anticuerpo de la presente invención, puede ser de cualquier subtipo siempre que sea una molécula de anticuerpo del tipo IgG. El anticuerpo puede ser un anticuerpo IgG multiespecífico (por ejemplo, biespecífico). Dicho anticuerpo biespecífico es un anticuerpo que tiene especificidades para los dos tipos de epítopos diferentes, e incluye anticuerpos que reconocen diferentes antígenos y estos reconocen diferentes epítopos en un único antígeno. Cuando moléculas de anticuerpo son minicuerpos tales como scFv y Fb cuya ruta metabólica principal es excreción renal, su farmacocinética en plasma no puede regularse controlando los puntos isoelectrónicos como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, la presente invención es aplicable a cualquier tipo de moléculas de anticuerpo siempre que sean polipéptidos que comprendan una región variable de anticuerpo cuya ruta metabólica principal no es excreción renal. Dichos polipéptidos incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión, scFv-Fc, dAb-Fc y Fc. Ya que la ruta metabólica principal de estas moléculas no es excreción renal, su farmacocinética en plasma puede controlarse modificando el punto isoelectrónico usando los métodos de la presente invención. Las moléculas de anticuerpo para las que es aplicable la presente invención también incluyen moléculas de tipo anticuerpo. Las "moléculas de tipo anticuerpo" se refieren a moléculas que actúan mediante unión con sus moléculas diana (Binz HK, Amstutz P, Pluckthun A. Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. *Nat Biotechnol.* Oct 2005; 23(10):1257-68), e incluyen, por ejemplo, DARPin, aficuerpos y avimeros.

Cuando un anticuerpo de la presente divulgación es, por ejemplo, un anticuerpo antiglipicano 3 biespecífico, se puede unir específicamente no solamente con glipicano 3 sino también con un epítipo de un antígeno distinto de glipicano 3. Dichos antígenos distintos de glipicano 3 incluyen preferentemente, por ejemplo, antígenos de superficie que permiten la unión específica con células NK, linfocitos T citotóxicos, células LAK y otras células para reclutar estas células. Se ha indicado que en presencia de un anticuerpo biespecífico preparado a partir del anticuerpo MUSE11 que reconoce un antígeno relacionado con adenocarcinoma MUC1 y anticuerpo OKT3 que reconoce un antígeno de superficie de células LAK, las células LAK ejercieron actividad citotóxica contra carcinoma de conductos

biliares (Katayose Y, Kudo T, Suzuki M, Shinoda M, Saijyo S, Sakurai N, Saeki H, Fukuhara K, Imai K, Matsuno S. MUC1-specific targeting immunotherapy with bispecific antibodies: inhibition of xenografted human bile duct carcinoma growth. *Cancer Res.* (1996) 56(18):4205-12). Pueden usarse preferentemente anticuerpos de glipicano 3 con farmacocinética en plasma mejorada, que se proporciona por la presente invención, en lugar del anticuerpo MUSE11 que reconoce MUC1. Además, también pueden usarse anticuerpos de glipicano 3 biespecíficos que reconocen diferentes epítomos en una molécula de glipicano 3 como anticuerpos preferidos de la presente invención.

El "anticuerpo biespecífico" mencionado anteriormente puede ser, por ejemplo, un anticuerpo que tiene una estructura en la que una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera están unidas en una única cadena (por ejemplo, sc(Fv)₂). El anticuerpo biespecífico también puede ser una molécula de tipo anticuerpo (por ejemplo, scFv-Fc) producida fusionando un scFv (o sc(Fv)₂), en el que una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera están unidas, con un dominio Fc (una región constante que carece del dominio CH1). Un anticuerpo multiespecífico que consiste en scFv-Fc tiene una estructura de tipo (scFv)₂-Fc con VH1-enlazador-VL1-Fc, como el primer polipéptido y VH2-enlazador-VL2-Fc como el segundo polipéptido. Como alternativa, el anticuerpo biespecífico puede ser una molécula de tipo anticuerpo en la que un anticuerpo de un único dominio está unido con un dominio Fc (*Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* (2006) 9(2):184-93).

En la presente invención, la carga de resto de aminoácidos puede modificarse mediante sustitución de aminoácidos. La sustitución de aminoácidos puede conseguirse por los métodos descritos posteriormente.

Para conservar la actividad de unión a antígeno, como la diana de sustitución en la presente invención, el resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de la región CDR es preferentemente al menos un resto de aminoácido seleccionado de los restos de aminoácidos en las posiciones 31, 61, 62, 64 y 65 en la región variable de cadena pesada y en las posiciones 24, 27, 53, 54 y 55, numeración de Kabat, en la región variable de cadena ligera. Dichas sustituciones de aminoácido son ventajosas porque la función original (actividad de unión a antígeno o similares) de los polipéptidos que comprenden una región variable de anticuerpo antes de la sustitución de aminoácidos se conserva y que pueden conseguirse las sustituciones independientemente de la especificidad de anticuerpo.

Además, la presente invención proporciona métodos para controlar farmacocinética de polipéptidos que comprende una región variable de anticuerpo modificando sus puntos isoelectrónicos. También se incluyen en la presente invención polipéptidos que comprenden una región variable de anticuerpo con farmacocinética controlada obtenida por dichos métodos.

En el presente documento, "farmacocinética de plasma controlado" significa que cuando la farmacocinética del anticuerpo en plasma se compara antes y después de la modificación de aminoácidos que constituyen un anticuerpo, la farmacocinética en plasma se ha cambiado en una dirección deseada. Específicamente, cuando se desea prolongar la semi-vida (en plasma) de un anticuerpo como un fármaco, "farmacocinética en plasma controlada" significa prolongación de la semi-vida en plasma del anticuerpo. Como alternativa, cuando se desea cortar la semi-vida en plasma del anticuerpo, "farmacocinética en plasma controlada" significa acortamiento de la semi-vida en plasma del anticuerpo.

En la presente invención, se puede evaluar apropiadamente si la farmacocinética del anticuerpo en plasma se ha cambiado en una dirección deseada, es decir, si la farmacocinética en plasma se ha controlado como se pretendía mediante ensayos cinéticos usando, por ejemplo, ratones, ratas, conejos, perros, monos u otros. En la presente invención, "prolongación de la semivida en plasma" o "acortamiento de la semi-vida en plasma" también pueden evaluarse usando en lugar de la semi-vida en plasma (t_{1/2}), uno cualquiera de los parámetros: tiempo de conservación medio en plasma, eliminación (CL) en plasma, área bajo la curva de concentración (ABC) y semi-vida en plasma (*Pharmacokinetics: Enshunioru Rikai (Understanding through practice)*). La "cinética en plasma controlada" conseguida de acuerdo con la presente invención puede evaluarse apropiadamente usando los parámetros, por ejemplo, llevando a cabo análisis no compartimental de acuerdo con el protocolo adjunto al software de análisis cinético *in vivo* WinNonlin (*Pharsight*).

La función de anticuerpo puede mantenerse controlando la farmacocinética en plasma. Por ejemplo, los métodos de la presente invención pueden aplicarse a mantener la función de anticuerpos que tienen citotoxicidad y regular la duración de las funciones que los polipéptidos tienen antes de la modificación, tales como efecto citotóxico, actividad antagonista y actividad agonista.

En el presente documento, "resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie" típicamente se refiere a un resto de aminoácido localizado en la superficie de un polipéptido que constituye un anticuerpo. "Resto de aminoácido localizado en la superficie de un polipéptido" se refiere a un resto de aminoácido cuya cadena lateral puede estar en contacto con moléculas de disolvente (que son en general moléculas de agua). Sin embargo, la cadena lateral completa no está necesariamente en contacto con moléculas de disolvente. Cuando al menos una parte de la cadena lateral esté en contacto con moléculas de disolvente, el resto de aminoácido se define como un "aminoácido localizado en la superficie". Los expertos en la materia pueden preparar un modelo de homología para un polipéptido o anticuerpo por modelización de homología o similares usando software disponible en el mercado.

Basándose en el modelo de homología, pueden seleccionarse restos de aminoácidos en la superficie de un polipéptido que constituye un anticuerpo apropiado como “restos de aminoácidos en la superficie del polipéptido”.

En el presente documento, los “restos de aminoácidos que pueden exponerse en la superficie” no están particularmente limitados; sin embargo, los restos de aminoácidos se localizan preferentemente en un dominio del anticuerpo distinto del dominio de unión a FcRn. Dicho dominio de unión a FcRn preferido incluye, por ejemplo, dominio Fc.

En la presente divulgación, los restos de aminoácidos cuya carga se va a modificar son preferentemente restos de aminoácidos que constituyen una región variable de cadena pesada o ligera de anticuerpo. Específicamente, la región variable incluye preferentemente CDR y FR.

Los expertos en la materia pueden seleccionar convenientemente restos de aminoácidos de superficie en la región variable de anticuerpo usando modelos de homología producidos por modelización de homología y similares. Por ejemplo, se seleccionan preferentemente restos de aminoácidos de superficie en la región variable de anticuerpo de restos de aminoácidos de regiones variables de cadena pesada H1, H3, H5, H8, H10, H12, H13, H15, H16, H19, H23, H25, H26, H31, H39, H42, H43, H44, H46, H61, H62, H64, H65, H68, H71, H72, H73, H75, H76, H81, H82b, H83, H85, H86, H105, H108, H110 y H112, numeración de Kabat. Por ejemplo, en la región FR de cadena pesada del anticuerpo de glipicano 3 humanizado de SEQ ID NO: 195, son ejemplos de aminoácidos de superficie los restos de aminoácidos en las posiciones 1, 3, 5, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 19, 23, 25, 26, 39, 42, 43, 44, 46, 69, 72, 73, 74, 76, 77, 82, 85, 87, 89, 90, 107, 110, 112 y 114, sin limitarse a las mismas. Para la región CDR de cadena pesada, pueden seleccionarse aminoácidos de superficie usando modelos de homología similares. Específicamente, el resto de aminoácido H97, numeración de Kabat, se expone en la superficie de la mayoría de los anticuerpos y, por ejemplo, Ser en la posición 101 en la CDR de cadena pesada del anticuerpo de glipicano3 humanizado de SEQ ID NO: 195 corresponde a ese resto de aminoácido. Otros restos de aminoácidos en la CDR de cadena pesada del anticuerpo de glipicano 3 humanizado de SEQ ID NO: 195 incluyen preferentemente restos de aminoácidos en las posiciones 52, 54, 62, 63, 65 y 66.

En la región variable de cadena ligera, se seleccionan preferentemente restos de aminoácidos de superficie en la región variable de anticuerpo de los restos de aminoácidos L1, L3, L7, L8, L9, L11, L12, L16, L17, L18, L20, L22, L24, L27, L38, L39, L41, L42, L43, L45, L46, L49, L53, L54, L55, L57, L60, L63, L65, L66, L68, L69, L70, L74, L76, L77, L79, L80, L81, L85, L100, L103, L105, L106 y L107, numeración de Kabat. Los restos de aminoácidos en las posiciones 1,3, 7, 8, 9, 11, 12, 16, 17, 18, 20, 22, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 54, 62, 65, 68, 70, 71,73, 74, 75, 79, 81, 82, 84, 85, 86, 90, 105, 108, 110, 111 y 112 en el anticuerpo de glipicano 3 humanizado de SEQ ID NO: 195 son ejemplos de aminoácidos de superficie. Sin embargo, los aminoácidos de superficie de la presente invención no se limitan a los mismos. Además, para la región CDR de cadena ligera, pueden seleccionarse restos de aminoácidos de superficie usando módulos de homología similares a los usados para determinar los restos de aminoácidos de superficie en la CDR de cadena pesada. Los restos de aminoácidos en la CDR de cadena ligera del anticuerpo de glipicano 3 humanizado de SEQ ID NO: 201 incluyen, preferentemente, restos de aminoácidos en las posiciones 24, 27, 33, 55 y 59.

Específicamente, en los métodos de la presente invención, “modificación” de un resto de aminoácido se refiere a sustitución de un resto de aminoácido original por un resto de aminoácido diferente, supresión de un resto de aminoácido original, adición de un resto de aminoácido extra y así sucesivamente. La “modificación” se refiere preferentemente a sustitución de un resto de aminoácido original por un resto de aminoácido diferente. Específicamente, en la presente invención, “modificación de la carga de un resto de aminoácido” preferentemente se refiere a sustituciones de aminoácidos.

Dicha “modificación de la carga de un resto de aminoácido” en un anticuerpo de glipicano 3 de la presente divulgación se consigue preferentemente, por ejemplo, modificando la carga de al menos un resto de aminoácido seleccionado de los restos de aminoácidos en las posiciones 19, 43, 52, 54, 62, 63, 65, 66 y 107 en la región variable de cadena pesada que constituye el anticuerpo de glipicano 3 humanizado de SEQ ID NO: 195. Como alternativa, la modificación se consigue preferentemente, por ejemplo, modificando la carga de al menos un resto de aminoácido seleccionado de los restos de aminoácidos en las posiciones 17, 24, 27, 33, 55, 59, 79, 82 y 105 en la región variable de cadena ligera que constituye el anticuerpo de glipicano 3 humanizado de SEQ ID NO: 201. De los restos de aminoácidos mencionados anteriormente, no es necesario modificar restos de aminoácidos distintos de aquellos cuya carga ya se ha modificado, siempre que la modificación haya conseguido el efecto pretendido de controlar la farmacocinética en plasma. Sin embargo, estos restos de aminoácidos pueden modificarse apropiadamente para ser eléctricamente neutros o para tener el mismo tipo de carga que los restos de aminoácidos modificados.

La “modificación de la carga de un resto de aminoácido” anteriormente descrita en la CDR de un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano (6R_a_H1L1) de la presente divulgación se consigue preferentemente conservando al mismo tiempo su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, modificando al menos un resto de aminoácido seleccionado de los restos de aminoácidos en las posiciones 31, 64 y 65, numeración de Kabat, en la región variable de cadena pesada que constituye un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano de SEQ ID NO: 221. Como alternativa,

se consigue preferentemente la modificación, por ejemplo, modificando la carga de al menos un resto de aminoácido seleccionado de los restos de aminoácidos en las posiciones 24, 27, 53 y 55, numeración de Kabat, en la región variable de cadena ligera que constituye el anticuerpo anti receptor de IL-6 humano de SEQ ID NO: 224. Entre los restos de aminoácidos mencionados anteriormente, no es necesario modificar restos de aminoácidos distintos de aquellos cuya carga ya se ha modificado, siempre que la modificación haya conseguido el efecto pretendido de controlar la farmacocinética en plasma. Sin embargo, estos restos de aminoácidos pueden modificarse apropiadamente para ser eléctricamente neutros o tener el mismo tipo de carga que los restos de aminoácidos modificados.

La “modificación de la carga de un resto de aminoácido” anteriormente descrita en la CDR de un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano (6R_b_H1L1) de la presente divulgación se consigue preferentemente conservando al mismo tiempo la actividad de unión a antígeno, por ejemplo, modificando la carga de al menos un resto de aminoácido seleccionado de los restos de aminoácidos en la región variable de cadena pesada que constituye el anticuerpo anti receptor de IL-6 humano de SEQ ID NO: 227, por ejemplo, el resto de aminoácido de la posición 31, numeración de Kabat. Como alternativa, la modificación se consigue preferentemente, por ejemplo, modificando la carga de al menos un resto de aminoácido seleccionado de los restos de aminoácidos en las posiciones 24, 53, 54 y 55, numeración de Kabat, en la región variable de cadena ligera que constituye el anticuerpo anti receptor de IL-6 humano de SEQ ID NO: 229. Entre los restos de aminoácidos mencionados anteriormente, no es necesario modificar restos de aminoácidos distintos de aquellos cuya carga ya se ha modificado, siempre que la modificación haya conseguido el efecto pretendido de controlar la farmacocinética en plasma. Sin embargo, estos restos de aminoácidos pueden modificarse apropiadamente para ser eléctricamente neutros, o para tener el mismo tipo de carga que los restos de aminoácidos modificados.

La “modificación de la carga de un restos de aminoácido” anteriormente descrita en la CDR de un anticuerpo anti GPC3 humano de la presente divulgación se consigue preferentemente conservando al mismo tiempo la actividad de unión a antígeno, por ejemplo, modificando la carga de al menos un resto de aminoácido seleccionado de los restos de aminoácidos en las posiciones 61, 62, 64 y 65, numeración de Kabat, en la región variable de cadena pesada que constituye el anticuerpo anti GPC3 humano de SEQ ID NO: 233. Como alternativa, la modificación se consigue preferentemente, por ejemplo, modificando la carga de al menos un resto de aminoácido seleccionado de los restos de aminoácidos en las posiciones 24 y 27, numeración de Kabat, en la región variable de cadena ligera que constituye el anticuerpo anti GPC3 de SEQ ID NO: 236. Entre los restos de aminoácidos mencionados anteriormente, no es necesario modificar restos de aminoácido distintos de aquellos cuya carga ya se ha modificado, siempre que la modificación haya conseguido el efecto pretendido de controlar la farmacocinética en plasma. Sin embargo, estos restos de aminoácidos pueden modificarse apropiadamente para ser eléctricamente neutros, o para tener el mismo tiempo de carga que los restos de aminoácidos modificados.

La “modificación de la carga de un resto de aminoácido” anteriormente descrita en la CDR de un anticuerpo anti receptor de IL-31 humano de la presente divulgación se consigue preferentemente conservando al mismo tiempo la actividad de unión a antígeno, por ejemplo, modificando la carga de al menos un resto de aminoácido seleccionado de los restos de aminoácidos en las posiciones 61, 62, 64 y 65, numeración de Kabat, en la región variable de cadena pesada que constituye el anticuerpo anti receptor de IL-31 humano de SEQ ID NO: 239. Como alternativa, la modificación se consigue preferentemente, por ejemplo, modificando la carga de al menos un resto de aminoácido seleccionado de los restos de aminoácidos 24 y 54, numeración de Kabat, en la región variable de cadena ligera que constituye el anticuerpo anti receptor de IL-31 humano de SEQ ID NO: 242. Entre los restos de aminoácidos mencionados anteriormente, no es necesario modificar restos de aminoácidos distintos de aquellos cuya carga ya se ha modificado, siempre que la modificación haya conseguido el efecto pretendido de controlar la farmacocinética en plasma. Sin embargo, estos restos de aminoácidos pueden modificarse apropiadamente para ser eléctricamente neutros, o para tener el mismo tipo de carga que los restos de aminoácidos modificados.

Se sabe que los aminoácidos incluyen aminoácidos con carga. Los aminoácidos conocidos en general que tienen carga positiva (aminoácidos con carga positiva) son lisina (K), arginina (R) e histidina (H). Los aminoácidos conocidos que tienen carga negativa (aminoácidos con carga negativa) incluyen ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E). Se sabe que otros son aminoácidos sin carga.

Preferentemente, los “restos de aminoácidos modificados” anteriormente descritos se seleccionan apropiadamente de los restos de aminoácidos en uno de los grupos (a) y (b) posteriores:

- (a) ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D); y
- (b) lisina (K), arginina (R) e histidina (H).

Sin embargo, los restos de aminoácidos no están limitados a estos ejemplos.

En una realización preferida, los restos de aminoácidos se sustituyen por restos de aminoácido sin carga cuando los restos de aminoácidos originales (antes de la modificación) ya tienen carga. Específicamente, la modificación de la presente invención incluye: (1) sustitución de un aminoácido con carga por un aminoácido sin carga; (2) sustitución de un aminoácido con carga por un aminoácido que tiene carga opuesta; y (3) sustitución de un aminoácido sin

carga por un aminoácido con carga.

En la presente invención, los restos de aminoácidos que constituyen un anticuerpo preferentemente se modifican para cambiar el punto isoelectrico del anticuerpo. Cuando hay múltiples restos de aminoácidos para modificar, estos pueden incluir varios restos de aminoácidos sin carga.

Se describen posteriormente ejemplos de “modificación de la carga de un resto de aminoácido” preferida en un anticuerpo de glipicano 3 de la presente divulgación. Las modificaciones para aumentar el valor del punto isoelectrico incluyen, por ejemplo, introducción de al menos una sustitución seleccionada de Q43K, D52N y Q107R en la región variable de cadena pesada que constituye el anticuerpo de glipicano 3 humanizado de SEQ ID NO: 195. Más preferentemente, la secuencia que se sustituye con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 198. Las modificaciones para aumentar el valor de punto isoelectrico incluyen también, por ejemplo, introducción de al menos una sustitución seleccionada de E17Q, Q27R y Q105R en la región variable de cadena ligera que constituye el anticuerpo de glipicano 3 humanizado de SEQ ID NO: 201. Más preferentemente, la secuencia se sustituye con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 204. Al mismo tiempo, las modificaciones para reducir el valor de punto isoelectrico incluyen, por ejemplo, introducción de al menos una sustitución seleccionada de K19T, Q43E, K63S, K65Q y G66D en la región variable de cadena pesada que constituye el anticuerpo de glipicano 3 humanizado de SEQ ID NO: 195. Más preferentemente, la secuencia se sustituye con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 197. Las modificaciones para reducir el valor de punto isoelectrico también incluyen, por ejemplo, la introducción de al menos una sustitución seleccionada de Q27E, K79T y R82S en la región variable de cadena ligera que constituye el anticuerpo de glipicano 3 humanizado de SEQ ID NO: 201. Más preferentemente, la secuencia se sustituye con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 203.

Los ejemplos de “modificación de la carga de un resto de aminoácido” preferida en un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano (6R_a_H1L1) proporcionados por la presente divulgación incluyen sustituciones de al menos un aminoácido seleccionadas de las sustituciones de aminoácido enumeradas en la Tabla 20.

Los ejemplos de “modificación de la carga de un resto de aminoácido” preferida en un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano (6R_b_H1L1) proporcionados por la presente divulgación incluyen sustituciones de al menos un aminoácido seleccionadas de las sustituciones de aminoácido enumeradas en la Tabla 22.

Los ejemplos de “modificación de la carga de un resto de aminoácido” preferida en un anticuerpo anti GPC3 humano proporcionados por la presente divulgación incluyen sustituciones de al menos un aminoácido seleccionadas de las sustituciones de aminoácido enumeradas en la Tabla 24.

Los ejemplos de “modificación de la carga de un resto de aminoácido” preferida en un anticuerpo anti receptor de IL-31 humano proporcionados por la presente divulgación incluyen sustituciones de al menos un aminoácido seleccionadas de las sustituciones de aminoácido enumeradas en la Tabla 27.

En la presente invención, el número de restos de aminoácidos para modificar no está particularmente limitado. Por ejemplo, cuando se modifica una región variable de anticuerpo, es preferible modificar un número suficiente, pero mínimo, de restos de aminoácidos para conseguir farmacocinética en plasma controlada como se pretende para evitar pérdida de la actividad de unión a antígeno y para evitar un aumento de la inmunogenicidad. Como alternativa, las modificaciones de aminoácidos para aumentar la actividad de unión a antígeno pueden combinarse apropiadamente con modificaciones de aminoácidos para reducir la inmunogenicidad.

La actividad de unión a antígeno de un anticuerpo puede determinarse usando métodos conocidos, por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA) e inmunoensayo de fluorescencia. Los métodos se describen en un texto convencional, Antibodies A Laboratory Manual (Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

Los métodos para determinar la actividad de unión a célula de un anticuerpo incluyen, por ejemplo, los métodos descritos en las páginas 359 a 420 en Antibodies A Laboratory Manual (Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Específicamente, la actividad puede evaluarse usando células como un antígeno basado en el principio de Biacore, ensayo de proliferación celular, ELISA o FACS (separación de células activadas por fluorescencia). Cuando se usa ELISA, la actividad de unión a célula de un anticuerpo se evalúa cuantitativamente comparando los niveles de señales generados en la reacción enzimática. Específicamente, se añade un anticuerpo de ensayo a cada placa de ELISA inmovilizada con células de expresión forzada, y se detecta anticuerpo de ensayo unido a célula usando un anticuerpo marcado con enzima que reconoce el anticuerpo de ensayo. Como alternativa, cuando se usa FACS, la actividad de unión a célula de anticuerpos puede compararse preparando una serie de delecciones de un anticuerpo de ensayo y determinando el título de la unión con células de expresión forzada para cada uno de los anticuerpos.

Cuando no se inmoviliza un antígeno en un vehículo tal como una placa de ELISA, sino que se expresa en la superficie de células suspendidas en tampón o similares, la unión de un anticuerpo con el antígeno puede ensayarse usando FACS. Los citómetros de flujo que se usan en este ensayo incluyen, por ejemplo, FACSCanto™ II,

FACSAria™, FACSAria™, FACSVantage™ SE y FACSCalibur™ (todos los cuales son de BD Biosciences); y EPICS ALTRA HyPerSort, Cytomics FC 500, EPICS XL-MCL ADC, EPICS XL ADC y Cell Lab Quanta / Cell Lab Quanta SC (todos los cuales son de Beckman Coulter).

Los métodos preferidos para determinar la actividad de unión a antígeno en un anticuerpo incluyen, por ejemplo, métodos analíticos que comprenden: hacer reaccionar un anticuerpo de ensayo con células que expresan el antígeno, teñir las células con un anticuerpo secundario marcado con FITC que reconoce el anticuerpo de ensayo, ensayar las células usando FACSCalibur (BD) y determinar después la necesidad de fluorescencia usando software CellQuest (BD). Cuando se usa FACSCalibur para la medición, después de teñir las células con un anticuerpo secundario marcado con FITC que reconoce específicamente el anticuerpo de ensayo unido al antígeno en la superficie de las células que expresan antígeno en los métodos descritos anteriormente, la unión puede evaluarse comparando el valor de media geométrica (valor de media Geo de ensayo) con un valor de media Geo de control obtenido usando un anticuerpo de control. Los valores de media geométrica se obtienen por un método que analiza la intensidad de fluorescencia usando software CellQuest (BD Biosciences). Se describe una fórmula para determinar los valores de media Geo (medias geométricas) en la Guía del Usuario del software CellQuest (BD Biosciences).

Para no aumentar la inmunogenicidad *in vivo* en seres humanos a los que se ha administrado un anticuerpo, las secuencias de aminoácidos después de modificación en la presente invención son preferentemente secuencias humanas (secuencias de un anticuerpo natural derivado del ser humano), pero no se limitan a las mismas. Además, para convertir cada una de las FR modificadas (FR1, FR2, FR3 y FR4) en una secuencia humana, se introducen preferentemente mutaciones en posiciones distintas de las que se han modificado para modificación del punto isoelectrico. El método de reemplazar cada FR con una secuencia humana de esta manera se ha presentado en un documento no de patente (Ono K, Ohtomo T, Yoshida K, Yoshimura Y, Kawai S, Koishihara Y, Ozaki S, Kosaka M, Tsuchiya M. The humanized anti-HM1.24 antibody effectively kills multiple myeloma cells by human effector cell-mediated cytotoxicity. Mol. Immunol. (1999) 36(6):387-395). Además, para modificar el punto isoelectrico de un anticuerpo, cada FR puede modificarse en otra FR humana con un punto isoelectrico modificado (por ejemplo, FR3 puede reemplazarse con otra FR humana para un punto isoelectrico más bajo). Dicho método de humanización se ha presentado en un documento no de patente (Dall'Acqua WF, Damschroder MM, Zhang J, Woods RM, Widjaja L, Yu J, Wu H. Antibody humanization by framework shuffling. Methods. (2005) 36(1):43-60).

Además, cuando un polipéptido de interés con farmacocinética en plasma controlada no puede producirse por modificaciones ligeras de la carga de superficie, el anticuerpo deseado con farmacocinética en plasma controlada puede obtenerse preferentemente repitiendo la modificación de la carga de superficie y evaluación de la farmacocinética en plasma.

En un documento no de patente (J Immunol. (1998) 160(2): 1029-35), se compararon EP5C7.g4 quimérico, un anticuerpo anti E, P-selectina quimérico (IgG4) y HuEP5C7.g4, un anticuerpo anti E, P-selectina humanizado IgG4) y se mostró que sus farmacocinéticas en plasma de mono Rhesus eran comparables entre sí. En otro documento no de patente (Gobburu JV, Tenhoor C, Rogge MC, Frazier DE Jr, Thomas D, Benjamin C, Hess DM, Jusko WJ. Pharmacokinetics/dynamics of 5c8, a monoclonal antibody to CD 154 (CD40 ligand) suppression of an immune response in monkeys. J Pharmacol Exp Ther. (1998) 286(2):925-30), se compararon un anticuerpo anti CD154 quimérico, ch5d8, y un anticuerpo anti CD154 humanizado, Hu5c8, y se reveló que sus farmacocinéticas en plasma de mono cinomolgus eran comparables. Además, otro documento no de patente (kashmiri SV, Shu L, Padlan EA, Milenic DE, Schlom J, Hand PH., Generation, characterization, and in vivo studies of humanized anticarcinoma antibody CC49. Hybridoma. (1995) 14 (5):461-73) mostró que un anticuerpo quimérico cCC49 y un anticuerpo humanizado HuCC49 tenían farmacocinéticas comparables en plasma de ratón. Además, los documentos no de patente (Graves SS, Goshorn SC, Stone DM, Axworthy DB, Reno JM, Bottino B, Searle S, Henry A, Pedersen J, Rees AR, Libby RT. Molecular modeling and preclinical evaluation of the humanized NR-LU-13 antibody. Clin Cancer Res. (1999) 5(4):899-908; Couto JR, Blank EW, Peterson JA, Ceriani RL. Anti-BA46 monoclonal antibody Mc3: humanization using a novel positional consensus and in vivo and in vitro characterization. Cancer Res. (1995) 55(8):1717-22) mostraron que los anticuerpos de ratón y humanizados mostraban las mismas características de farmacocinética y distribución en plasma de ratón. Esto sugiere que la farmacocinética y distribución en plasma del anticuerpo quimérico y anticuerpo humanizado son comparables porque los Fc tanto de ratón como humanos tienen reactividad cruzada con FcRn de ratón. Como se ve a partir de estos ejemplos, un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado que comparten la misma CDR muestran las mismas características de farmacocinética en plasma. Específicamente, cuando un anticuerpo se humaniza por métodos conocidos tales como el descrito en un documento no de patente (Nat Biotechnol. (1997) 15(7):637-40), la farmacocinética del anticuerpo humanizado en plasma es comparable con la del anticuerpo quimérico; por tanto, no pueden producirse anticuerpos humanizados con farmacocinética en plasma controlada mediante métodos conocidos.

Sin embargo, con los métodos de la presente invención, un anticuerpo humanizado cuya farmacocinética en plasma está controlada (específicamente, cuya semi-vida en plasma se prolonga o se acorta) en comparación con el anticuerpo quimérico pueden producirse modificando restos de aminoácidos que pueden exponerse en la superficie del anticuerpo quimérico en el proceso de humanización para modificar el punto isoelectrico del anticuerpo. Pueden modificarse aminoácidos que pueden exponerse en la superficie de un anticuerpo humanizado para controlar su

farmacocinética en plasma en el momento de humanización del anticuerpo. Como alternativa, el punto isoelectrico de un anticuerpo humanizado puede modificarse adicionalmente usando un anticuerpo humanizado como un material de partida y modificando los restos de aminoácidos que pueden exponerse en su superficie.

En la presente invención, el punto isoelectrico puede determinarse por isoelectroenfoque, que se conoce por los expertos en la materia. El punto isoelectrico teórico puede determinarse usando software de análisis de secuencias génicas y de aminoácidos (GENETYX y similares). Esto es útil para la presente invención cuando es necesaria modificación considerable del punto isoelectrico, por ejemplo, para control suficiente de la farmacocinética en plasma u otros fines. Se prefiere particularmente cuando sea necesario modificar el punto isoelectrico teórico en 1,0 o más, y se prefiere más cuando es necesario modificar el punto isoelectrico en 3,0 o más.

En un documento no de patente (Adams CW, Allison DE, Flagella K, Presta L, Clarke J, Dybdal N, McKeever K, Sliwkowski MX. Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab. Cancer Immunol Immunother. (2006) 55(6):717-27), tres tipos de anticuerpos humanizados, trastuzumab, bevacizumab y pertuzumab, que se produjeron mediante humanización usando la misma secuencia de FR de anticuerpo humano, mostraron farmacocinética en plasma casi comparable. Específicamente, cuando se produjeron mediante humanización, usando una misma secuencia de FR, los anticuerpos muestran farmacocinética en plasma casi comparable. Además del proceso de humanización descrito anteriormente, los métodos de la presente invención permiten el control de la concentración de un anticuerpo (en plasma) como un fármaco modificando el punto isoelectrico del anticuerpo mediante modificación de restos de aminoácidos que pueden exponerse en la superficie del anticuerpo.

Los métodos de la presente invención también son aplicables a anticuerpos humanos. Pueden producirse anticuerpos humanos cuya farmacocinética en plasma se controla (específicamente, la semivida en plasma se prolonga o se acorta) en comparación con los anticuerpos humanos originales preparados en la primera etapa modificando sus puntos isoelectricos mediante modificación de restos de aminoácidos que pueden exponerse en la superficie de anticuerpos humanos preparados a partir de bibliotecas de anticuerpos humanos, ratones productores de anticuerpos humanos o similares.

La semivida en plasma del anticuerpo se prolonga cuando su valor de punto isoelectrico se reduce. Por el contrario, la semivida en plasma del anticuerpo se acorta cuando su valor de punto isoelectrico aumenta. Se sabe que los puntos isoelectricos mayores aumentan la transferencia de anticuerpos a tejidos (Vaisitti T, Deaglio S, Malavasi F. Cationization of monoclonal antibodies: another step towards the "magic bullet"? J Biol Regul Homeost Agents. (2005) 19(3-4): 105-12; Pardridge WM, Buciak J, Yang J, Wu D. Enhanced endocytosis in cultured human breast carcinoma cells and in vivo biodistribution in rats of a humanized monoclonal antibody after cationization of the protein. (1998) 286(1):548-54). Sin embargo, dichos anticuerpos muestran inmunogenicidad aumentada y actividad de internalización en células, y, por lo tanto, es necesaria una mejora adicional para producir anticuerpos eficaces para terapias de cáncer que se basen en mecanismos tales como actividades citotóxicas, ADCC y CDC, que se inhiben por la actividad de internalización de células. Específicamente, no se entiende si un aumento o una reducción del valor del punto isoelectrico potencia el efecto antitumoral de anticuerpos eficaces para terapias de cáncer que se basen en mecanismos tales como actividades citotóxicas, ADCC y CDC, que se inhiben por actividad de internalización en células. En la presente invención, se produjeron anticuerpos modificados con punto isoelectrico aumentado o reducido a partir de anticuerpos humanizados y sus efectos antitumorales se compararon para ver qué modificación proporciona un efecto antitumoral más fuerte. Sorprendentemente, el resultado mostró que los anticuerpos humanizados con punto isoelectrico reducido ejercían un efecto superior en cáncer de hígado.

Los anticuerpos producidos por modificación adicional de los anticuerpos anteriormente descritos con carga modificada de restos de aminoácidos como material de partida por sustitución, supresión, adición y/o inserción de restos de aminoácidos se incluyen en los "anticuerpos" de la presente invención. Los anticuerpos producidos por modificación adicional de la carga de los restos de aminoácidos de anticuerpos cuya secuencia de aminoácidos se ha modificado por sustitución de aminoácidos, supresión, adición y/o inserción de restos de aminoácidos, o quimerización, humanización o similares también se incluyen en los "anticuerpos" de la presente invención.

Las modificaciones preferidas para mejorar las características de anticuerpos proporcionados por la presente invención incluyen, por ejemplo, modificaciones para mejorar la estabilidad de anticuerpos (en lo sucesivo en el presente documento denominadas "modificación de la estabilidad"). En una solución acuosa, existe un anticuerpo en equilibrio entre dos estados, concretamente, estado nativo y estado de desnaturalización inactivo. Como se ve por la segunda ley de la termodinámica ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$), la estabilidad del estado nativo depende del cambio de energía libre de Gibbs del ΔG en el sistema, así como el equilibrio entre el cambio de entalpía del ΔH (que refleja cambios en la interacción hidrófoba, enlaces de hidrógeno y similares en la cadena polipeptídica) y cambio de entropía ΔS (que refleja cambios en la solvatación y en el grado de libertad conformacional), ambos de los cuales contribuyen al cambio de energía libre de Gibbs. Los valores de ΔG positivos implican que una proteína es más estable en el estado nativo que en el estado de desnaturalización. Cuanto mayor sea el valor positivo de Δ , más estable será la proteína en el estado nativo. Para desnaturalizar una proteína, es necesario retirar fuerzas que contribuyen a esta estabilidad. Por ejemplo, cuando una solución proteica se expone a alta temperatura, se aumenta la libertad conformacional, dando como resultado alteración de factores que contribuyen a la estabilidad de proteínas. Esto

conduce a desnaturalización térmica de proteínas. El término $-TAS$ es dominante en dicha desnaturalización. El ΔH para desplegamiento de proteínas provocado por desnaturalización térmica puede determinarse directamente mediante calorimetría de exploración diferencial (DSC), como se describe específicamente en los ejemplos del presente documento. Una curva de DSC para el proceso de desnaturalización térmica de proteínas proporciona un pico endotérmico a una temperatura denominada punto medio de desnaturalización (T_m), que es intrínseco a las proteínas de ensayo individuales. La entalpía de desnaturalización se determina integrando el pico. El valor de T_m actúa en general como un indicador de la estabilidad térmica. El cambio de capacidad térmica (ΔC_p) en la desnaturalización de proteínas también puede determinarse mediante DSC. El cambio de capacidad térmica asociado con desnaturalización térmica está provocado principalmente por hidratación de restos de aminoácidos no expuestos en la superficie molecular en el estado nativo sino expuestos a moléculas de disolventes como resultado de la desnaturalización de proteínas.

Como se ha descrito anteriormente, la “modificación” de restos de aminoácidos en los métodos proporcionados por la presente invención significa específicamente sustitución de un resto de aminoácido original por un resto de aminoácido diferente, supresión de un resto de aminoácido original, adición de un resto de aminoácido extra y similares. La modificación preferida es sustitución de un resto de aminoácido original por un resto de aminoácido diferente. Específicamente, en la presente invención, se prefiere la modificación por sustitución de aminoácidos para la modificación de la estabilidad de anticuerpos. La modificación de estabilidad conseguida modificando restos de aminoácidos de un anticuerpo aumenta el valor de T_m del anticuerpo. Específicamente, el valor de T_m se usa preferentemente como un indicador para modificación de la estabilidad de anticuerpo.

Para un anticuerpo de glipicano 3 proporcionado por la presente divulgación, se consigue “modificación de estabilidad” preferentemente, por ejemplo, modificando al menos un resto de aminoácido seleccionado de los restos de aminoácidos en las posiciones 37, 40, 48 y 51 en la región variable de cadena pesada que constituye el anticuerpo de glipicano 3 humanizado de SEQ ID NO: 195. Como alternativa, se consigue preferentemente “modificación de estabilidad” por ejemplo, modificando al menos un resto de aminoácido seleccionado de los restos de aminoácidos en las posiciones 2, 25, 42, 48, 50, 83 y 84 en la región variable de cadena ligera que constituye el anticuerpo de glipicano 3 humanizado de SEQ ID NO: 201. De los restos de aminoácidos mencionados anteriormente, no es necesario modificar los restos de aminoácidos distintos de los que ya han experimentado modificación de estabilidad, siempre que se consiga la T_m deseada. Sin embargo, estos restos de aminoácidos pueden modificarse apropiadamente para tener una T_m comparable o mayor que el anticuerpo de glipicano 3 humanizado antes de la modificación.

La modificación de estabilidad puede llevarse a cabo modificando aleatoriamente cada resto de aminoácido que constituye el anticuerpo humanizado para modificar. Como alternativa, puede llevarse a cabo modificación de estabilidad sustituyendo una parte de la secuencia de aminoácidos que constituye un anticuerpo humanizado para modificar con la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo conocido con T_m alta que corresponde estructuralmente a la parte de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humanizado para modificar. Las posiciones de resto de aminoácidos para modificar no están particularmente limitadas; sin embargo, pueden modificarse preferentemente restos de aminoácidos en la región FR. Como alternativa, los restos de aminoácidos en la región CDR también pueden modificarse apropiadamente siempre que la modificación no altere la actividad de unión a antígeno. Además, el número de restos de aminoácidos para modificar no está particularmente limitado, y un segmento particular dentro de la región FR puede sustituirse con un segmento deseado. Todos los segmentos en la región FR, FR1, FR2, FR3 y FR4, o una combinación de uno o más de los segmentos pueden modificarse.

Los segmentos de región FR preferidos para modificación incluyen, por ejemplo, regiones FR2 de cadena pesada y cadena ligera. Específicamente, la modificación preferida incluye, por ejemplo, modificación de restos de aminoácidos para modificar la FR2 de la cadena pesada de un anticuerpo de glipicano 3 humanizado de la subclase VH1b, que se muestra en SEQ ID NO: 195, a una FR2 de la subclase VH4, concretamente, V37I que es la sustitución de valina por isoleucina en la posición 37, y modificaciones similares de A40P, M48I y L51I. Como alternativa, la modificación preferida incluye, por ejemplo, modificación de la región FR2 de cadena ligera de un anticuerpo de glipicano 3 humanizado de la subclase VK2 que se muestra en SEQ ID NO: 201, a una FR2 de la subclase VK3, concretamente, modificaciones de L42Q, S48A y Q50R, así como modificación de V2I que corresponde a modificación de FR1 a una secuencia de línea germinal.

Pueden conseguirse preferentemente modificaciones de secuencias de aminoácidos tales como sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos y humanización y quimerización mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Cuando los anticuerpos de la presente invención se preparan como anticuerpos recombinantes, de forma similar, las secuencias de aminoácidos de las regiones variables y constantes de anticuerpos también pueden modificarse preferentemente mediante sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos.

Se usan preferentemente en la presente invención anticuerpos derivados de cualquier animal, tales como anticuerpos de ratón, ser humano. Rata, conejo, cabra o camello. Además, pueden usarse preferentemente anticuerpos modificados que incluyen sustituciones de aminoácidos en su secuencia, tales como anticuerpos quiméricos y en particular anticuerpos humanizados. También pueden usarse preferentemente productos de

modificaciones de anticuerpos unidos con diversas moléculas.

Los "anticuerpos quiméricos" son anticuerpos preparados combinando secuencias derivadas de diferentes animales. Un ejemplo preferido es un anticuerpo que tiene regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo de ratón y regiones constantes de cadena pesada y ligera de un anticuerpo humano. Pueden prepararse anticuerpos quiméricos por métodos conocidos. Por ejemplo, un ADN que codifica una región variable de anticuerpo y un ADN que codifica una región constante de un anticuerpo humano se fusionan en fase, el ADN recombinante resultante se inserta en un vector de expresión usado habitualmente, se cultiva un hospedador en el que se ha introducido el vector y un anticuerpo quimérico se obtiene o aísla apropiadamente del cultivo celular.

Los "anticuerpos humanizados" también se denominan anticuerpos humanos remodelados, y pueden obtenerse uniendo la CDR de un anticuerpo de mamífero no humano, por ejemplo, anticuerpo de ratón y la FR de un anticuerpo humano. Una secuencia de ADN que codifica un anticuerpo humanizado puede sintetizarse mediante PCR solapante, usando varios oligonucleótidos como moldes. Se describen materiales y métodos para PCR solapante en el documento WO98/13388 o similares. Un ADN que codifica la región variable de un anticuerpo humanizado de la presente invención puede obtenerse mediante PCR solapante usando varios oligonucleótidos diseñados para incluir secuencias oligonucleotídicas que solapan entre sí, y se ligan en fase con un ADN que codifica la región constante de anticuerpo humano para formar una secuencia codónica. El ADN ligado de este modo se inserta después en un vector de expresión de una manera expresable, y se introduce en un hospedador.

Se conocen métodos para identificar 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 de recombinación genética generales adecuadas para este fin (véase Publicación de Solicitud de Patente Europea EP 125023; y documento WO96/02576). Por ejemplo, puede determinarse la CDR de un anticuerpo animal no humano tal como un anticuerpo de ratón, y se prepara un ADN de modo que codifique un anticuerpo en el que la CDR se liga con la FR de un anticuerpo humano. Se seleccionan FR de anticuerpo humanas unidas mediante CDR de modo que las CDR formen un sitio de unión a antígeno adecuado. Si se requiere, pueden modificarse restos de aminoácidos en las FR de una región variable de anticuerpo de modo que las CDR del anticuerpo humano remodelado puedan formar un sitio de unión a antígeno adecuado (Sato, K. *et al.*, Cancer Res. (1993) 53:851-856). Los restos de aminoácido modificables en las FR incluyen restos que se unen directamente con un antígeno mediante enlaces no covalentes (Amit *et al.*, Science (1986) 233:747-53), restos que tienen alguna influencia o efecto en la estructura de CDR (Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. (1987) 196:901-17), y restos implicados en la interacción entre región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera (Publicación de patente EP 239400).

Un vector de expresión usado habitualmente insertado con el ADN se transforma o se transduce a una célula hospedadora, y el anticuerpo humanizado codificado por el ADN se produce y aísla a partir del cultivo celular cultivando la célula hospedadora.

Cuando los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos humanizados o humanos, las regiones constantes de estos anticuerpos derivan preferentemente de anticuerpos humanos. Por ejemplo, pueden usarse Cy1, Cy2, Cy3 y Cy4 para la región constante de cadena pesada mientras que pueden usarse preferentemente Ck y Cl para la región constante de cadena ligera. La región constante de anticuerpo humano puede modificarse según se requiera para mejorar el anticuerpo o su estabilidad de producción. Un anticuerpo quimérico de la presente invención 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 CDR de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano y FR y unas regiones constantes de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humano preferentemente incluye CDR de un anticuerpo derivado de ser humano y FR y regiones constantes de un anticuerpo humano. Las regiones constantes de los anticuerpos humanos incluyen secuencias de aminoácidos específicas que corresponden al isotipo de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Las regiones constantes de los anticuerpos humanizados proporcionados por la presente invención pueden ser las regiones constantes de anticuerpos en cualquier isotipo. Se usa una región constante de IgG humano. Las FR de un anticuerpo humano para usar como FR de los anticuerpos humanizados y humanos no están particularmente limitadas y pueden derivar de un anticuerpo de cualquier isotipo.

Para reducir la inmunogenicidad, pueden sustituirse algunos o todos los restos de aminoácidos que constituyen la región FR por una secuencia de línea germinal usando un método similar al descrito en el documento no de patente (Mol Immunol. (1999) 36(6):387-395). Esto se basa en la predicción racional de que las secuencias de línea germinal tienen menor inmunogenicidad. La secuencia de aminoácidos que constituye la región FR de un anticuerpo humanizado se alinea y compara con secuencias de aminoácidos de línea germinal (Abhinandan K. R. y Martin C. R., J. Mol. Biol. (2007) 369:852-862). Los restos de aminoácidos que constituyen una región FR de un anticuerpo humanizado que se ha descubierto que son diferentes en la comparación anterior pueden sustituirse con restos de aminoácido de línea germinal, siempre que la sustitución no dé como resultado la pérdida de actividad en un antígeno. Específicamente, dichas sustituciones incluyen, por ejemplo, sustitución de L por I en la posición 70, T por R en la posición 87 y T por A en la posición 97, que son los restos de aminoácidos que constituyen la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 195. Además, las sustituciones también incluyen sustitución de S por A en la posición 25, en la que es el resto de aminoácido el que constituye la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:

201.

Uno o más de los aminoácidos que constituyen las regiones variables y constantes de anticuerpos quiméricos, humanos o humanizados modificados de la presente invención pueden modificarse mediante supresión, sustitución, inserción y/o adición, siempre que los anticuerpos muestren especificidad de unión a un antígeno.

Ya que la inmunogenicidad de anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos que comprenden secuencias derivadas de ser humano en el cuerpo humano se ha atenuado, se espera que sean útiles cuando se administren a seres humanos para fines terapéuticos o similares.

Pueden usarse secuencias conocidas para los genes que codifican la cadena pesada o cadena ligera de anticuerpos antes de la introducción de mutaciones por métodos de la presente invención. Como alternativa, pueden obtenerse nuevas secuencias para genes de anticuerpos mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden obtenerse preferentemente de una biblioteca de anticuerpos. Los genes también pueden clonarse de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales por un método conocido tal como RT-PCR usando su ARNm como molde.

Con respecto a bibliotecas de anticuerpos, se conocen ya muchas bibliotecas de anticuerpos. Ya que también se conocen métodos para producir bibliotecas de anticuerpos, los expertos en la materia pueden obtener o producir apropiadamente bibliotecas de anticuerpos. Los ejemplos incluyen bibliotecas de fagos de anticuerpos desveladas en 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 Kohyo de patente japonesa N.º (JP-A) H20-504970 (publicación de fase nacional japonesa no examinada correspondiente a una publicación internacional no japonesa). Además, pueden usarse preferentemente métodos conocidos tales como métodos que usan células eucariotas en la preparación de bibliotecas (panfleto WO95/15393) y métodos de presentación de ribosomas. Además, también se conocen técnicas para obtener anticuerpos humanos mediante selección usando bibliotecas de anticuerpos humanos. Por ejemplo, se expresan anticuerpos monocatenarios (scFv) obtenidos fusionando regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpo humano en fase en la superficie de fagos usando métodos de presentación en fagos. Después, se seleccionan fagos que se unen con antígenos para aislar genes que codifican scFv de unión a anticuerpo de los fagos. Las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos que se unen con los antígenos pueden determinarse secuenciando los genes. Un anticuerpo humano puede obtenerse apropiadamente insertando un gen de anticuerpo que comprende las secuencias en vectores de expresión adecuados, y expresando el gen en células hospedadoras adecuadas como se describe posteriormente. Estos métodos ya se conocen bien, y se puede consultar los documentos WO92/01047, WO92/20791, WO93/06213 WO93/11236, WO93/19172, WO95/01438 y WO95/15388.

Básicamente, se usan técnicas conocidas para métodos para obtener genes que codifican anticuerpos de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales. Los detalles se describirán posteriormente; brevemente, se obtienen preferentemente genes de anticuerpos inmunizando un animal con un antígeno sensibilizador deseado de acuerdo con métodos de inmunización convencionales, fusionando las células inmunitarias obtenidas del animal con células parentales conocidas por métodos de fusión celular comunes, explorando células productoras de anticuerpos monoclonales (hibridoma) mediante métodos de exploración comunes, sintetizando ADNc de regímenes variables de anticuerpos de ARNm de los hibridomas obtenidos como molde usando transcriptasa inversa y uniéndolos con ADN que codifica las regiones constantes de anticuerpos deseadas en fase.

Más específicamente, se muestran posteriormente ejemplos preferibles, pero no se limitan particularmente a los mismos. Las sensibilizaciones de antígenos para obtener los anticuerpos proporcionados por la presente invención incluyen tanto antígenos completos con inmunogenicidad como antígenos incompletos compuestos de haptenos y similares que no muestran inmunogenicidad. Por ejemplo, pueden usarse preferentemente proteínas de longitud completa, y sus polipéptidos y péptidos parciales. La proteína del núcleo GPC33 soluble de SEQ ID NO: 207 es un ejemplo adecuado. Además, se sabe que las sustancias compuestas de polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y similares pueden actuar como antígenos. Por lo tanto, no hay ninguna limitación particular sobre los antígenos de los anticuerpos de la presente invención. Los antígenos pueden prepararse por métodos conocidos por los expertos en la materia, y pueden prepararse, por ejemplo, por los siguientes métodos usando baculovirus (por ejemplo, documento WO98/46777). Cuando la inmunogenicidad de un antígeno es baja, puede unirse preferentemente con una macromolécula que tiene inmunogenicidad, tal como albúmina, y después usarse para inmunizar animales. Cuando se usan moléculas transmembrana como antígenos, pueden usarse fragmentos polipeptídicos extracelulares de las moléculas como un antígeno sensibilizador preferible. Como alternativa, también pueden usarse células que expresan las moléculas en su superficie como un antígeno sensibilizador. Cuando los antígenos sensibilizadores son moléculas insolubles, las moléculas pueden solubilizarse uniéndose con moléculas solubles en agua, y las moléculas de unión solubilizadas se usan preferentemente como un antígeno sensibilizador.

Pueden obtenerse células productoras de anticuerpos preferentemente inmunizando animales usando antígenos sensibilizadores adecuados descritos anteriormente. Como alternativa, pueden prepararse células productoras de anticuerpos mediante inmunización *in vitro* de linfocitos que pueden producir anticuerpos. Pueden usarse diversos

animales vertebrados y mamíferos como los animales para inmunización. En particular, se usaron en general, roedores, lagomorfos y primates. Los ejemplos de dichos animales incluyen ratones, ratas y hámsteres para roedores, conejos para lagomorfos y monos incluyendo el mono cinomolgus, mono Rhesus, hamadriade y chimpancés para primates. Además, también se conocen animales transgénicos que portan repertorios de genes de anticuerpos humanos, y pueden obtenerse preferentemente anticuerpos humanos usando estos animales (véase el documento WO96/34096; Mendez *et al.*, Nat. Genet. (1997) 15:146-56). En lugar de usar dichos animales transgénicos, pueden obtenerse anticuerpos humanos deseados que tienen actividad de unión contra antígenos mediante, por ejemplo, sensibilización *in vitro* de linfocitos humanos con antígenos deseados o células que expresan los antígenos deseados, y fusionando después los linfocitos sensibilizados con células de mieloma humano tales como U266 (véase publicación Kokoku de solicitud patente japonesa N.º (JP-B) H1-59878 (solicitud de patente japonesa aprobada, examinada, publicada para oposición)). Además, pueden obtenerse preferentemente anticuerpos humanos deseados inmunizando animales transgénicos que portan en sus genomas un repertorio completo de genes de anticuerpos humanos con antígenos deseados (véase documentos WO93/12227, WO92/03918, WO94/02602, WO96/34096 y WO96/33735).

Puede llevarse a cabo inmunización animal diluyendo y suspendiendo apropiadamente un antígeno sensibilizador en solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica o similares, y formando una emulsión mezclando un adyuvante si es necesario, y después inyectando por vía intraperitoneal o por vía subcutánea el antígeno sensibilizador a animales. Después de esto, el antígeno sensibilizador mezclado con adyuvante incompleto de Freund se administra preferentemente varias veces cada 4 a 21 días. La producción de anticuerpos contra el antígeno sensibilizador en los animales inmunizados puede confirmarse midiendo el título de anticuerpo en sueros animales usando métodos convencionales, por ejemplo, métodos conocidos tales como ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y citometría de flujo (FACS).

Pueden fusionarse células productoras de anticuerpos obtenidas de linfocitos o animales inmunizados con un antígeno deseado con células de mieloma para generar hibridomas usando agentes de fusión convencionales (por ejemplo, polietilenglicol) (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986, 59-103). Pueden producirse hibridomas preferentemente, por ejemplo, mediante los métodos de Milstein *et al.* (G. Kohler y C. Milstein, Methods Enzymol. (1981) 73:3-46). Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales que se unen específicamente con una proteína antigénica producida por los hibridomas cultivando y dejando crecer los hibridomas obtenidos de este modo. La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales por las proteínas antigénicas puede medirse apropiadamente usando métodos de análisis conocidos, tales como inmunoprecipitación, radioinmunoensayo (RIA) y ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y citometría de flujo (FACS). A continuación, pueden subclonarse hibridomas que producen anticuerpos de interés cuya especificidad, afinidad o actividad se han determinado mediante métodos tales como dilución limitante, si es necesario. Finalmente, los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas pueden aislarse.

A continuación, pueden clonarse genes que codifican los anticuerpos seleccionados a partir de hibridomas o células productoras de anticuerpo (linfocitos sensibilizados y similares) usando sondas que pueden unirse específicamente con los genes (por ejemplo, oligonucleótidos complementarios de secuencias que codifican las regiones constantes de anticuerpo). Clonando mediante RT-PCR también es posible usar el ARNm obtenido de hibridomas o células productoras de anticuerpos (linfocitos sensibilizados y similares) como molde. Las inmunoglobulinas se clasifican en cinco clases diferentes, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM de acuerdo con sus estructuras y funciones. Estas clases se dividen adicionalmente en varios isotipos (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; IgA1 e IgA2; y similares). La clase y subclase de anticuerpos proporcionados por la presente invención no están particularmente limitadas y puede ser cualquiera de estas clases o subclases; sin embargo, IgG es una clase particularmente preferida.

Es posible modificar genes que codifican las secuencias de aminoácidos que constituyen cadena pesada y cadena ligera usando técnicas de ingeniería genética. Pueden producirse apropiadamente anticuerpos modificados genéticamente tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados que se han modificado artificialmente para el fin de reducir la antigenicidad heteróloga contra seres humanos y similares para anticuerpos tales como anticuerpos de ratón, anticuerpos de rata, anticuerpos de conejo, anticuerpos de hámster, anticuerpos de oveja y anticuerpos de camello modificando restos de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos que constituyen los anticuerpos. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos compuestos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera derivadas de un anticuerpo de mamífero no humano, por ejemplo, anticuerpo de ratón, y las regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo humano. Pueden obtenerse ligando el ADN que codifica una región variable de un anticuerpo de ratón con el ADN que codifica una región constante de un anticuerpo humano, incorporándolos en un vector de expresión e introduciendo el vector en un hospedador para producción del anticuerpo. Un anticuerpo humanizado, que también se denomina un anticuerpo humano remodelado, es un anticuerpo en el que una FR de anticuerpo humano se liga en fase con la CDR de un anticuerpo de mamífero no humano, por ejemplo, anticuerpo de ratón, para formar una secuencia codónica. Una secuencia de ADN que codifica este anticuerpo humanizado puede obtenerse mediante PCR solapante usando varios oligonucleótidos como moldes. Los materiales y métodos para PCR solapantes se describen en el documento WO98/13388 o similares.

Un ADN que codifica la región variable de un anticuerpo recombinante de la presente invención puede obtenerse mediante PCR solapante usando varios oligonucleótidos diseñados para incluir secuencias oligonucleotídicas que solapan entre sí, y se ligan en fase con un ADN que codifica la región constante de anticuerpo humano para formar una secuencia codónica. El ADN ligado de este modo puede incorporarse en un vector de expresión de una manera expresable, y el vector puede introducirse en un hospedador. Un anticuerpo codificado por el ADN se expresa cultivando el hospedador. Se obtienen anticuerpos expresados purificando adecuadamente la solución de cultivo del hospedador o similares (véase el documento EP239400 y WO96/02576). Las FR de anticuerpos humanos para ligar mediante la CDR se seleccionan cuando la CDR forma un sitio de unión a antígeno favorable contra el antígeno. Si es necesario, los restos de aminoácidos en la FR de una región variable de anticuerpo pueden sustituirse de modo que la CDR del anticuerpo humano remodelado forme un sitio de unión a antígeno apropiado contra el antígeno (K. Sato *et al.*, Cancer Res. (1993) 53:851-856).

Además de la humanización descrita anteriormente, los anticuerpos pueden modificarse para mejorar sus propiedades biológicas tales como actividad de unión con un antígeno reconocido por el anticuerpo. En la presente invención, dichas modificaciones pueden llevarse a cabo usando métodos tales como mutagénesis dirigida (véase, por ejemplo, Kunkel Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82:488), mutagénesis de PCR y mutagénesis de casete. En general, los anticuerpos mutantes cuyas propiedades biológicas han mejorado muestran identidad secuencia de aminoácidos y/o similitudes 70 % o mayor, más preferentemente 80 % o mayor y aún más preferentemente 90 % o mayor (por ejemplo, 95 % o mayor, 97 %, 98 %, 99 %, etc.), en comparación con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo para modificar (concretamente, un anticuerpo a partir del que se ha preparado el anticuerpo modificado). En el presente documento, la identidad y/o similitud de secuencias se define como la relación de restos de aminoácidos que son homólogos (mismos restos) o similares (restos de aminoácidos clasificados en el mismo grupo basado en las propiedades generales de cadenas laterales de aminoácidos) a los restos de aminoácidos de un anticuerpo a partir del que se prepara el anticuerpo modificado, después de haberse maximizado el valor de identidad de secuencia mediante alineamiento de secuencias e introducción de huecos, si es necesario. En general, los restos de aminoácidos de origen natural se clasifican en grupos basados en las características de sus cadenas laterales: (1) hidrófobos: alanina, isoleucina, 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 una realización preferida, las modificaciones que se dirigen a potenciar las funciones de anticuerpo preferentemente incluyen, por ejemplo, potenciación de la actividad citotóxica de anticuerpos incluyendo anticuerpos humanizados. Dichas actividades citotóxicas preferidas incluyen, por ejemplo, ADCC y CDC. En el presente documento, CDC se refiere a la actividad citotóxica del sistema del complemento. Cuando un anticuerpo específico se une con un antígeno en la superficie de célula diana, las células que portan receptor de Fc (células inmunitarias y otras) se unen con el Fc a través del receptor de Fc, y la actividad citotóxica ejercida contra células diana se denomina ADCC. Si un anticuerpo de ensayo tiene ADCC o CDC puede evaluarse por métodos conocidos (por ejemplo, Current protocols in Immunology, Capítulo 7. Immunologic studies in humans, Editor, John E. Coligan *et al.*, John Wiley & Sons, Inc., (1993)).

Específicamente, en primer lugar, se preparan células efectoras, soluciones del complemento y células diana.

(1) Preparación de células efectoras

Se escinden bazos de ratones CBA/N o similares, y después se separan células del bazo en medio RPMI 1640 (Invitrogen). Pueden prepararse células efectoras lavando las células con el mismo medio que contiene suero bovino fetal al 10 % (FBS, HyClone) y ajustando después la concentración celular a 5×10^6 células/ml.

(2) Preparación de solución del complemento

Pueden prepararse soluciones del complemento mediante dilución 10x de complemento de cría de conejo (CEDARLANE) en un medio (Invitrogen) que contiene FBS 10 %.

(3) Preparación de células diana

Las células diana que expresan la proteína antigénica con la que se une un anticuerpo de ensayo pueden radiomarcarse incubándolas con 0,2 mCi de [^{51}Cr] cromato sódico (GE Healthcare Bioscience) en DMEM complementado con FBS 10 % a 37 °C durante una hora. Las células que expresan la proteína antigénica con la que se une un anticuerpo de ensayo incluyen células transformadas con el gen que codifica la proteína antigénica con la que se une un anticuerpo de ensayo, células de cáncer de ovario, células de cáncer de próstata, células de cáncer de mama, células de cáncer uterino, células de cáncer de hígado, células de cáncer de pulmón, células de cáncer pancreático, células de cáncer de estómago, células de cáncer de vejiga urinaria y células de cáncer de colon. Las células diana pueden prepararse lavando las células radiomarcadas tres veces con medio RPMI1640 complementado con FBS 10 % y ajustando la concentración celular a 2×10^5 células/ml.

ADCC y CDC pueden determinarse por el método descrito posteriormente. El ensayo de ADCC se lleva a cabo añadiendo 50 µl/pocillo de cada una de las células diana y anticuerpo de ensayo en una placa de fondo redondo de 96 pocillos (Becton Dickinson) e incubándolo en hielo durante 15 minutos. Después, se añaden 100 µl de las células efectoras y la mezcla de reacción resultante se incuba en un incubador de gas de dióxido de carbono durante cuatro horas. El anticuerpo de ensayo puede usarse apropiadamente a una concentración final en un intervalo de 0 a 10 µg/ml. Después de la incubación, se toman muestras de 100 µl de sobrenadante y se determina su radiactividad usando un contador gamma (COBRAII AUTO-GAMMA, MODELO D5005, Packard Instrument Company). La actividad citotóxica (%) puede calcularse a partir del valor de radiactividad obtenido de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$(A-C) / (B-C) \times 100$$

donde A representa la radiactividad (cpm) de cada muestra de anticuerpo de ensayo, B representa la radiactividad (cpm) de una muestra que contiene NP-40 1 % (Nacalai Tesque) y C representa la radiactividad (cpm) de una muestra que contiene solamente células diana.

Se llevó a cabo ensayo de CDC añadiendo 50 µl/pocillo de cada una de las células diana y anticuerpo de ensayo en una placa de fondo plano de 96 pocillos (Becton Dickinson) e incubándolo en hielo durante 15 minutos. Después, se añaden 100 µl de la solución de complemento y la mezcla de reacción resultante se incuba en un incubador de gas de dióxido de carbono durante cuatro horas. El anticuerpo de ensayo puede usarse de forma apropiada a una concentración final en un intervalo de 0 a 3 µg/ml. Después de la incubación, se toman muestras de 100 µl de sobrenadante y su radiactividad se determina usando un contador gamma. La actividad citotóxica puede calcularse por el mismo método usado para la determinación de ADCC.

La actividad citotóxica del conjugado de anticuerpo se determina añadiendo 50 µl/pocillo de cada uno de las células diana y conjugado de anticuerpo de ensayo en una placa de fondo plano de 96 pocillos (Becton Dickinson) e incubándolo en hielo durante 15 minutos. La placa se incuba en un incubador de gas de dióxido de carbono durante una a cuatro horas. El anticuerpo puede usarse de forma apropiada a una concentración final en un intervalo de 0 a 3 µg/ml. Después de la incubación, se toman muestras de 100 µl de sobrenadante y su radiactividad se determina usando un contador gamma. La actividad citotóxica puede calcularse por el mismo método usado para determinación de ADCC.

Como se ha descrito anteriormente, las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo generalmente consisten en tres CDR y cuatro FR. En una realización preferida de la presente invención, pueden seleccionarse apropiadamente restos de aminoácidos para someterse a "modificación", por ejemplo, de restos de aminoácidos que constituyen una CDR o FR.

Usando bases de datos públicas tales como Kabat, los expertos en la materia pueden obtener fácilmente una secuencia de aminoácidos que constituye una FR de región variable de anticuerpo que existe de hecho en un organismo tal como ser humano o ratón.

En una realización preferida, la presente invención proporciona anticuerpos humanizados cuya farmacocinética en plasma se controla por los métodos de la presente invención. Dichos anticuerpos humanizados incluyen, por ejemplo, anticuerpos humanizados que comprenden CDR derivada de animal no humano, FR derivada de ser humano y región constante humana, y cuya farmacocinética en plasma se controla en relación con un anticuerpo quimérico que comparte la misma región constante, en la que al menos un resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de la CDR o FR de anticuerpo tiene carga opuesta al resto de aminoácido en la posición correspondiente en la CDR o FR del anticuerpo original.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona anticuerpos humanos cuya farmacocinética en plasma se controla por los métodos de la presente invención. Dichos anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo, anticuerpos humanos que comprenden la CDR derivada de ser humano, FR derivada de ser humano y región constante humana, y cuya farmacocinética en plasma se controla en relación con un anticuerpo quimérico que comparte la misma región constante, en la que al menos una resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de la CDR o FR de anticuerpo tiene carga opuesta al resto de aminoácido en la posición correspondiente en la CDR o FR del anticuerpo original.

La región constante humana preferentemente se refiere a una región que comprende el dominio Fc humano de tipo silvestre; sin embargo, también puede usarse preferentemente Fc modificado. El "Fc modificado" incluye Fc en el que se modifican restos de aminoácidos que constituyen el Fc, y Fc en el que la modificación del dominio Fc está alterada. Específicamente, dicha alteración de la modificación preferentemente incluye, por ejemplo, modificación del tipo de glucosilación en el dominio Fc. Un ejemplo preferido específico es el "anticuerpo con contenido reducido de fucosa ligado al dominio Fc de anticuerpo" desvelado específicamente en los Ejemplos Experimentales de Referencia del presente documento.

El "anticuerpo con contenido reducido de fucosa ligado al dominio Fc de anticuerpo" se refiere a un anticuerpo cuyo contenido de fucosa está significativamente reducido en relación con un anticuerpo de control, preferentemente uno con fucosa indetectable. En general, se añade fucosa a las cadenas de azúcares de enlace N-glucósido en dos sitios en los dominios Fc de dos moléculas de cadena pesada que constituyen una única molécula de anticuerpo. En el presente documento, el "anticuerpo con contenido reducido de fucosa ligado al dominio Fc de anticuerpo" se refiere a un anticuerpo que, cuando se compara con dicho anticuerpo común como control, tiene un contenido de fucosa de 50 % o menos, preferentemente de 25 % o menos, más preferentemente de 10 % o menos, aún más preferentemente de 0 % del contenido de cadena de azúcar total en el anticuerpo de control. El contenido de fucosa puede determinarse mediante los métodos analíticos específicos descritos posteriormente en los ejemplos experimentales de referencia. Se describen métodos para preparar dichos anticuerpos con contenido de fucosa reducido en los Ejemplos Experimentales de Referencia del presente documento. Dichos métodos incluyen también preferentemente, por ejemplo, los métodos de preparación usando células animales que son deficientes en fucosil transferasa (Biotechnol Bioeng. (2004) 87(5): 614-22) y métodos de preparación usando células animales con modificación de cadena de azúcar ramificada de tipo complejo alterada (Biotechnol Bioeng (2006) 93 (5): 851-61). Además, los métodos de preparación también incluyen preferentemente los que usan células no animales tales como células vegetales (Nature Biotechnology (2006) 24: 1591-7) o células de levadura (Nature Biotechnology (2006) 24: 210-5) como células hospedadoras.

En una realización preferida, la presente divulgación se refiere a un método para producir un polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo con un punto isoelectrico modificado, que comprende:

- (a) modificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido para modificar la carga de al menos un resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de la región CDR del polipéptido;
- (b) cultivar una célula hospedadora para expresar el ácido nucleico; y
- (c) recoger el polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo del cultivo de células hospedadoras.

En otra realización preferida, la presente descripción se refiere a un método para producir un polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo con farmacocinética en plasma controlada, que comprende:

- (a) modificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido para modificar la carga de al menos un resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de la región CDR del polipéptido;
- (b) cultivar una célula hospedadora para expresar el ácido nucleico; y
- (c) recoger el polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo del cultivo de células hospedadoras.

Además, los polipéptidos que comprenden una región variable de anticuerpo con farmacocinética en plasma controlada producidos por los métodos también se incluyen en la presente divulgación.

La presente invención proporciona métodos para producir polipéptidos multiespecíficos que comprenden un primer polipéptido y un segundo polipéptido que comprenden cada uno una región variable de anticuerpo. Además, la presente invención proporciona polipéptidos multiespecíficos producidos por los métodos. Una realización preferida de los métodos de producción de la presente invención es un método que comprende modificar uno o ambos de un ácido nucleico que codifica los restos de aminoácidos de un primer polipéptido y un ácido nucleico que codifica los restos de aminoácidos de un segundo polipéptido, para aumentar la diferencia entre los puntos isoelectricos del primer polipéptido y el segundo polipéptido. Es decir, pueden producirse anticuerpos multiespecíficos basándose en la diferencia en los puntos isoelectricos, y la diferencia puede aumentarse modificando las cargas de los restos de aminoácidos en el primer polipéptido y segundo polipéptido. Más específicamente, un método de producción preferido comprende las siguientes etapas de:

- (a) modificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido para modificar la carga de al menos un resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de la región CDR del primer polipéptido y el segundo polipéptido, modificando específicamente uno o ambos de un ácido nucleico que codifica los restos de aminoácidos de un primer polipéptido y un ácido nucleico que codifica los restos de aminoácidos de un segundo polipéptido, para aumentar la diferencia entre los puntos isoelectricos del primer polipéptido y un segundo polipéptido en comparación con antes de la modificación;
- (b) cultivar células hospedadoras para expresar los ácidos nucleicos; y
- (c) reducir un anticuerpo multiespecífico del cultivo de células hospedadoras.

En la presente divulgación, "polipéptidos" se refiere en general a péptidos y proteínas cuya longitud es de aproximadamente diez aminoácidos o mayor. Los polipéptidos derivan generalmente de organismos, pero no están particularmente limitados a los mismos, y, por ejemplo, pueden estar compuestos de una secuencia diseñada artificialmente. También pueden ser polipéptidos de origen natural, polipéptidos sintéticos, polipéptidos recombinantes o similares. Adicionalmente, también se incluyen fragmentos de los polipéptidos anteriormente mencionados en los polipéptidos de la presente invención.

En la presente divulgación, "polipéptidos multiespecíficos que comprenden un primer polipéptido y un segundo polipéptido que comprenden cada uno una región variable de anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende

una región variable de un anticuerpo que se une con dos o más tipos de epítomos diferentes, o diferentes epítomos en un único antígeno. Los polipéptidos que comprenden una región variable de anticuerpo incluyen, por ejemplo, los anticuerpos, minicuerpos y proteínas de armazón mencionadas anteriormente.

En la presente invención, la expresión “la diferencia entre los puntos isoelectrónicos de los polipéptidos aumenta” significa que los puntos isoelectrónicos de dos o más polipéptidos se hacen desiguales modificando las cargas de los aminoácidos en la superficie de cada polipéptido o aumentando la diferencia entre los puntos isoelectrónicos de dos o más polipéptidos. La diferencia en los puntos isoelectrónicos puede observarse, por ejemplo, usando una técnica tal como isoelectroenfoque. En la presente invención, los puntos isoelectrónicos se cambian preferentemente sin alterar la estructura y función (actividad) de los polipéptidos.

Es decir, la presente invención proporciona un método para producir un anticuerpo IgG multiespecífico que comprende un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en el que el método comprende las etapas de:

- (a) modificar uno o ambos de un ácido nucleico que codifica los restos de aminoácidos del primer polipéptido y un ácido nucleico que codifica los restos de aminoácidos del segundo polipéptido, de modo que la diferencia entre el punto isoelectrónico del primer polipéptido y el del segundo polipéptido sea de 1,0 o más, preferentemente 1,2 o más y más preferentemente 1,5 o más;
- (b) cultivar células hospedadoras para expresar los ácidos nucleicos; y
- (c) recoger el anticuerpo multiespecífico del cultivo de células hospedadoras.

Además, la presente invención proporciona un método para modificar un anticuerpo IgG multiespecífico para purificación de anticuerpos multiespecíficos que comprenden el primer polipéptido y segundo polipéptido. Una realización preferida del método de purificación de la presente invención es un método que comprende la etapa de modificar uno o ambos de un ácido nucleico que codifica los restos de aminoácidos de un primer polipéptido y un ácido nucleico que codifica los restos de aminoácidos de un segundo polipéptido, para aumentar la diferencia entre los puntos isoelectrónicos del primer polipéptido y segundo polipéptido. Es decir, la diferencia en puntos isoelectrónicos se introduce en los polipéptidos modificando las cargas de los restos de aminoácidos del primer polipéptido y segundo polipéptido. Los anticuerpos multiespecíficos pueden purificarse usando esta diferencia en puntos isoelectrónicos. Más específicamente, un método de purificación comprende las siguientes etapas de:

- (a) modificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido para modificar la carga de al menos un resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de la región CDR del primer polipéptido y segundo polipéptido, modificando específicamente uno o ambos de un ácido nucleico que codifica los restos de aminoácidos del primer polipéptido y un ácido nucleico que codifica los restos de aminoácidos del segundo polipéptido, para aumentar la diferencia entre los puntos isoelectrónicos del primer polipéptido y segundo polipéptido en comparación con antes de la modificación;
- (b) cultivar células hospedadoras para expresar los ácidos nucleicos; y
- (c) purificar dicho anticuerpo multiespecífico del cultivo de células hospedadoras por cromatografía convencional.

También se incluyen en la presente invención métodos para producir anticuerpos multiespecíficos que comprenden las etapas de purificación de los métodos de purificación anteriormente mencionados.

En los métodos de la presente invención, la expresión “modificación de ácidos nucleicos” se refiere a modificación de secuencias de ácido nucleico para formar codones que corresponden a los restos de aminoácidos que se introducen por “modificación” de la presente invención. Más específicamente, la expresión se refiere a modificación de ácidos nucleicos que constituyen codones para modificar a codones que codifican restos de aminoácidos introducidos por la modificación. Habitualmente, la expresión significa manipulación génica o mutagénesis que modifica al menos un nucleótido de un codón para producir un codón que codifica un resto de aminoácido de interés. Más específicamente, un codón que codifica el resto de aminoácido original se reemplaza por un codón que codifica el resto de aminoácido para introducir por la modificación. Dichas modificaciones de ácido nucleico pueden llevarse a cabo apropiadamente por los expertos en la materia usando técnicas conocidas, por ejemplo, mutagénesis dirigida o mutagénesis por PCR.

Los ácidos nucleicos de la presente invención se clonan (se insertan) en general en vectores adecuados y después se introducen en células hospedadoras. Estos vectores no están particularmente limitados en la medida en que los ácidos nucleicos insertados se mantengan estables. Por ejemplo, cuando se usa *Escherichia coli* (*E. coli*) como un hospedador, los vectores de clonación son preferentemente vectores pBluescript (Stratagene) y similares, mientras que pueden usarse diversos vectores disponibles en el mercado. Cuando se usan vectores para el fin de producir los polipéptidos de la presente invención, los vectores de expresión son particularmente útiles. No existe ninguna limitación particular sobre vectores de expresión, siempre que puedan expresar polipéptidos en tubos de ensayo, *E. coli*, células cultivadas u organismos individuales. Por ejemplo, los vectores preferidos incluyen vector pBEST (Promega) para expresión en tubos de ensayo, vector pET (Invitrogen) en *E. coli*, el vector pME18S-FL3 (n.º de referencia de GenBank AB009864) en células de cultivo, y el vector pME18S (Mol. Cell Biol. (1998) 8: 466-472) en organismos individuales. Puede realizarse inserción de los ADN de la presente invención en vectores, por ejemplo, por métodos convencionales tales como 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).

No hay ninguna limitación particular sobre las células hospedadoras anteriormente mencionadas, y se usan diversas células hospedadoras dependiendo del fin. Las células usadas para expresar polipéptidos incluyen células bacterianas (por ejemplo, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Streptomyces* y *Bacillus subtilis*), células fúngicas (por ejemplo, levadura y *Aspergillus*), células de insecto (por ejemplo, *Drosophila* S2 y *Spodoptera* SF9), células animales (por ejemplo, CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK293, células de melanoma de Bowes) y células vegetales. Los vectores pueden introducirse en células hospedadoras usando métodos conocidos, tales como el método de precipitación con fosfato cálcico, 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 y método de microinyección.

Para secretar anticuerpos expresados en células hospedadoras en el lumen del retículo endoplásmico, espacio periplásmico o ambiente extracelular, pueden incorporarse señales de secreción adecuadas en los anticuerpos de interés. Estas señales pueden ser intrínsecas o ajenas a los anticuerpos de interés.

Cuando los anticuerpos de la presente invención se secretan a medio de cultivo, los anticuerpos producidos por los métodos anteriormente mencionados pueden recogerse recolectando el medio. Cuando los anticuerpos de la presente invención se producen dentro de las células, las células se lisan en primer lugar, y después estos anticuerpos se recogen.

Los anticuerpos de la presente invención pueden preferentemente recogerse y purificarse de cultivos celulares recombinantes usando métodos conocidos, incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxipatita y cromatografía de lectina.

En la presente invención, los polipéptidos con modificación de ácidos nucleicos son preferentemente un homomultímero de un primer polipéptido, un homomultímero de un segundo polipéptido y un heteromultímero del primer polipéptido y el segundo polipéptido. Los ejemplos del homomultímero de un primer polipéptido, el homomultímero de un segundo polipéptido y el heteromultímero del primer polipéptido y segundo polipéptido incluyen los descritos en los Ejemplos, pero no se limitan a los mismos.

Los ejemplos de cromatografía convencional en la presente invención incluyen cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de hidroxipatita, cromatografía de interacción de carga hidrófoba y cromatografía de enfoque, pero no se limitan a los mismos.

En los métodos anteriormente mencionados de la presente invención, un primer polipéptido y un segundo polipéptido comprenden preferentemente una región variable de cadena pesada. La región variable puede comprender, por ejemplo, una CDR y una FR.

Además, en los métodos anteriormente mencionados de la presente invención, una región variable de un anticuerpo multiespecífico comprende preferentemente una región variable de cadena ligera.

Adicionalmente, en los métodos anteriormente mencionados de la presente invención, un primer polipéptido y un segundo polipéptido comprenden preferentemente regiones constantes de cadena pesada. Dichas regiones constantes de cadena pesada preferentemente generan diferencias entre los puntos isoelectrónicos del primer polipéptido y el segundo polipéptido. Los ejemplos de dichas regiones constantes de cadena pesada incluyen regiones constantes de anticuerpos que tienen diferentes puntos isoelectrónicos. La diferencia del punto isoelectrónico puede introducirse en el primer polipéptido y el segundo polipéptido usando las regiones constantes de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, que tienen puntos isoelectrónicos que son originalmente diferentes entre sí. Como alternativa, los aminoácidos en las regiones constantes de cadena pesada del primer polipéptido y el segundo polipéptido que provocan diferencias en el punto isoelectrónico entre estas subclases pueden modificarse solos, o en combinación con aminoácidos adyacentes que no tienen ningún efecto sobre los puntos isoelectrónicos para generar regiones constantes humanas de tipo no silvestre, y puede introducirse diferencia del punto isoelectrónico en las dos regiones constantes. Los ejemplos de posiciones para modificar para introducir diferencia de punto isoelectrónico en las regiones constantes incluyen, por ejemplo, las posiciones 137, 196, 203, 214, 217, 233, 268, 274, 276, 297, 355, 392, 419 y 435, numeración de EU, en la región constante de cadena pesada.

Además, ya que la retirada de cadenas de azúcar de una región constante de cadena pesada genera diferencia en el punto isoelectrónico, la posición 297, que es un sitio glucosilado, es otro ejemplo de una posición para modificar para introducir diferencia del punto isoelectrónico.

Para métodos que comprenden el primer polipéptido y segundo polipéptido mencionados anteriormente que comprenden una región constante de cadena pesada, los métodos que combinan con el método en el que el primer polipéptido y el segundo polipéptido mencionados anteriormente comprenden una región variable de cadena pesada y/o el método en el que el anticuerpo multiespecífico comprende un tercer polipéptido que comprende una región

variable de cadena ligera, y un primer polipéptido y un segundo polipéptido que forman cada uno un multímero con el tercer polipéptido, se incluyen en la presente invención.

También se incluyen en la presente invención anticuerpos IgG multiespecíficos producidos por los métodos anteriormente mencionados.

Además, en una realización, cuando el primer polipéptido en el anticuerpo multiespecífico proporcionado por la presente invención comprende una región variable de cadena pesada, al menos un resto de aminoácido en las posiciones 31, 61, 62, 64 y 65, numeración de Kabat, en la región variable de cadena pesada se hace portar una carga de modo que “la diferencia de los puntos isoeléctricos aumente”. En otra realización, cuando el polipéptido comprende una región variable de cadena ligera, al menos un resto de aminoácido en las posiciones 24, 27, 53, 54 y 55, numeración de Kabat, en la región variable de cadena ligera se hace portar una carga de modo que “la diferencia de puntos isoeléctricos aumente”. De los restos de aminoácidos del primer polipéptido indicados por la numeración anteriormente mencionada, los restos de aminoácidos distintos del resto de aminoácido con carga pueden tener el mismo tipo de carga que la del resto de aminoácido con carga, o pueden no tener carga, o pueden tener la carga opuesta a la del resto de aminoácido con carga, siempre que el punto isoeléctrico del primer polipéptido y el del segundo polipéptido sean diferentes.

Los anticuerpos multiespecíficos anteriormente mencionados de la presente invención comprenden un segundo polipéptido que tiene preferentemente la carga opuesta a la del resto de aminoácido con carga en el primer polipéptido, o no tenga carga. Más específicamente, el segundo polipéptido en los anticuerpos multiespecíficos comprende una región variable de cadena pesada y al menos un resto de aminoácido en las posiciones 31, 61, 62, 64 y 65, numeración de Kabat, en la región no tiene carga o tiene la carga opuesta a la del resto de aminoácido seleccionado para portar una carga en la región variable en el primer polipéptido. Además, cuando el segundo polipéptido comprende una región variable de cadena ligera, al menos un resto de aminoácido en las posiciones 24, 27, 53, 54 y 55, numeración de Kabat, en la región variable de cadena ligera no tiene carga o tiene la carga opuesta a la del resto de aminoácido seleccionado para portar una carga en la región variable en el primer polipéptido. De los restos de aminoácidos del segundo polipéptido indicados por la numeración anteriormente mencionada, los restos de aminoácidos distintos del resto de aminoácido con carga pueden tener el mismo tipo de carga que la del resto de aminoácido con carga, o pueden no tener carga, o pueden tener la carga opuesta a la del resto de aminoácido con carga, siempre que el punto isoeléctrico del primer polipéptido y del segundo polipéptido sean diferentes.

Para reducir los puntos isoeléctricos en anticuerpos multiespecíficos que comprenden una región constante de anticuerpo, es deseable aplicar, por ejemplo, una secuencia de IgG2 o IgG4 a la posición 137, una secuencia de IgG1, IgG2 o IgG4 a la posición 196, una secuencia de IgG2 o IgG4 a la posición 203, una secuencia de IgG2 a la posición 214, una secuencia de IgG1, IgG3 o IgG4 a la posición 217, una secuencia de IgG1, IgG3 o IgG4 a la posición 233, una secuencia de IgG4 a la posición 268, una secuencia de IgG2, IgG3, IgG4 a la posición 274, una secuencia de IgG1, IgG2 o IgG4 a la posición 276, una secuencia de IgG4 a la posición 355, una secuencia de IgG3 a la posición 392, una secuencia de IgG4 a la posición 419 y una secuencia de IgG1, IgG2 o IgG4 a la posición 435. Para aumentar puntos isoeléctricos, es deseable aplicar, por ejemplo, una secuencia de IgG1 o IgG3 a la posición 137, una secuencia de IgG3 a la posición 196, la secuencia de IgG1 o IgG3 a la posición 203, una secuencia de IgG1, IgG3 o IgG4 a la posición 214, una secuencia de IgG2 a la posición 217, una secuencia de IgG2 a la posición 233, una secuencia de IgG1, IgG2 o IgG3 a la posición 268, una secuencia de IgG1 a la posición 274, una secuencia de IgG3 a la posición 276, una secuencia de IgG1, IgG2 o IgG3 a la posición 355, una secuencia de IgG1, IgG2 o IgG4 a la posición 392, una secuencia de IgG1, IgG2 o IgG3 a la posición 419 y una secuencia de IgG3 a la posición 435.

No es necesario aplicar todas estas secuencias, siempre que haya suficiente diferencia entre los puntos isoeléctricos de las dos cadenas pesadas.

Con respecto a los anticuerpos anteriormente mencionados, la expresión “que tiene el mismo tipo de carga” significa, por ejemplo, que el resto de aminoácido anteriormente mencionado en la región variable de cadena pesada de acuerdo con la numeración de Kabat y el resto de aminoácido anteriormente mencionado en la región constante de cadena pesada de acuerdo con la numeración de EU portan ambos un resto de aminoácido incluido en uno de los grupos (a) y (b) posteriores.

- (a) ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D); y
- (b) lisina (K), arginina (R) e histidina (H).

La expresión “que tiene la carga opuesta” significa que, por ejemplo, al menos uno de los restos de aminoácidos anteriormente mencionados, por numeración de Kabat o numeración de EU, en el segundo polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada y/o una región constante de cadena pesada se incluye en uno de los grupos anteriormente mencionados (a) o (b), y su resto de aminoácido correspondiente en una posición en la región variable de cadena pesada y/o región constante de cadena pesada comprendida en el primer polipéptido se incluye en el otro grupo.

Más específicamente, la presente invención proporciona anticuerpos multiespecíficos, en los que los restos de aminoácidos anteriormente mencionados que tienen el mismo tipo de carga se seleccionan de los restos de aminoácidos incluidos en uno de los grupos anteriormente mencionados (a) o (b).

- 5 En una realización preferida de la presente invención, si el resto de aminoácido original (antes de la modificación) ya tiene carga, puede modificarse para ser un resto de aminoácido sin carga.

10 En la presente invención, un resto de aminoácido se modifica preferentemente de modo que la diferencia entre los puntos isoelectrónicos del primer polipéptido y el del segundo polipéptido se aumente. Además, cuando se introducen múltiples resto de aminoácidos por modificación, pueden incluirse algunos restos de aminoácidos sin carga en estos restos de aminoácidos.

15 Además, la presente invención se refiere a composiciones (agentes) que comprenden un polipéptido con farmacocinética en plasma controlada en la presente invención (un anticuerpo IgG) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En la presente invención, "composiciones farmacéuticas" se refiere en general a agentes para tratar o prevenir, o ensayar y diagnosticar enfermedades.

20 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse preferentemente por métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, dichas composiciones farmacéuticas pueden usarse de forma parenteral en forma de inyecciones, que son soluciones o suspensiones estériles preparadas con agua u otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, dichas composiciones pueden formularse combinando apropiadamente con un vehículo o medio farmacéuticamente aceptable, específicamente, agua estéril, solución salina fisiológica, aceite vegetal, emulsionante, suspensión, tensioactivo, estabilizante, agente saporífero, excipiente, vehículo, conservante, aglutinante o similares, y mezclarse en una forma de dosis unitaria que cumple los requisitos aceptados en general para preparación de productos farmacéuticos. En dichas preparaciones, la cantidad de principio activo se ajusta de modo que se obtenga una cantidad adecuada dentro de un intervalo específico.

30 Las composiciones estériles para inyección pueden formularse usando vehículos tales como agua destilada para inyección, de acuerdo con protocolos convencionales para formulación.

35 Las soluciones acuosas para inyección incluyen, por ejemplo, solución salina fisiológica y soluciones isotónicas que contienen glucosa u otros adyuvantes (por ejemplo, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro sódico). Pueden usarse en combinación solubilizantes apropiados, por ejemplo, alcoholes (etanol y similares), polialcoholes (propilenglicol, polietilenglicol y similares) y tensioactivos no iónicos (polisorbato 80™, HCO-50 y similares).

40 Los aceites incluyen aceites de sésamo y de soja. Pueden usarse bencil benzoato y/o alcohol bencílico como solubilizantes en combinación. También pueden combinarse tampones (por ejemplo, tampón de fosfato y tampón de acetato sódico), agentes lenitivos (por ejemplo, clorhidrato de procaina), estabilizantes (por ejemplo, alcohol bencílico y fenol) y/o antioxidantes. Las inyecciones preparadas generalmente se cargan en ampollas apropiadas.

45 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran preferentemente por vía parenteral. Por ejemplo, las composiciones pueden estar en forma de inyecciones, agentes transnasales, agentes transpulmonares o agentes transdérmicos. Por ejemplo, dichas composiciones pueden administrarse por vía sistémica o por vía local mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea o similares.

50 Los métodos de administración pueden seleccionarse apropiadamente considerando la edad de un paciente y los síntomas. La dosificación de una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un polinucleótido que codifica un anticuerpo pueden establecerse, por ejemplo, dentro del intervalo de 0,0001 a 1.000 mg/kg de peso para cada administración. Como alternativa, la dosificación puede ser, por ejemplo, de 0,001 a 100.000 mg por paciente. Sin embargo, en la presente invención, la dosificación no se limita necesariamente a los intervalos descritos anteriormente. Aunque la dosificación y el método de administración varían dependiendo del peso, la edad, los síntomas de un paciente y similares, los expertos en la materia pueden seleccionar dosificación y métodos de administración apropiados considerando los factores descritos anteriormente.

60 La presente invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican anticuerpos con farmacocinética en plasma controlada (por ejemplo, anticuerpos de glipicano 3 humanizados). Además, también se incluyen en la presente invención vectores que portan estos ácidos nucleicos.

65 La presente invención también proporciona células hospedadoras que portan los ácidos nucleicos descritos anteriormente. Las células hospedadoras no están particularmente limitadas e incluyen, por ejemplo, células bacterianas tales como *E. coli* y diversas células animales. Las células hospedadoras pueden usarse preferentemente, por ejemplo, como un sistema de producción para producir y expresar los anticuerpos de la presente invención. Más específicamente, la presente invención proporciona un sistema de producción para la producción de anticuerpos usando las células hospedadoras. Se usan preferentemente sistemas *in vitro* e *in vivo*

para producción de polipéptidos. Las células eucariotas o células procariotas son ejemplos preferibles usados en un sistema de producción *in vitro*.

Las células eucariotas que se usan como células hospedadoras incluyen, por ejemplo, células animales, células vegetales y células fúngicas. Las células animales incluyen: células de mamífero, por ejemplo, CHO (J. Exp Med (1995) 108: 945), COS, HEK293, 3T3, mieloma, BHK (riñón de cría de hámster), HeLa y Vero; células de anfibio tales como oocitos de *Xenopus laevis* (Valle, *et al*, Nature (1981) 291: 338-340); y células de insecto tales como Sf9, Sf21 y Tn5. Para expresar los anticuerpos de la presente invención, pueden usarse convenientemente CHO-DG44, CHO-DX11B, células COS7, células HEK293 y células BHK. De las células animales, son particularmente preferibles células CHO para expresión a gran escala. Pueden introducirse vectores en una célula hospedadora mediante, por ejemplo, métodos de fosfato cálcico, métodos de DEAE-dextrano, métodos que usan liposoma catiónico DOTAP (Boehringer-Mannheim), métodos de electroporación o métodos de lipofección.

Se sabe que células vegetales tales como células derivadas de *Nicotiana tabacum* y células de *Lemna minor* son sistemas de producción de proteínas, y estas células puede usarse para producir anticuerpos de la presente invención mediante métodos que cultivan callos de estas células. Se conocen sistemas de expresión de proteínas que usan células fúngicas incluyendo células de levadura, por ejemplo, células del género *Saccharomyces* (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, etc.), y células de hongos filamentosos, por ejemplo, el género *Aspergillus* (*Aspergillus niger*, etc.), y estas células pueden usarse como un hospedador para producir anticuerpos de la presente invención.

Cuando se usan células procariotas, se usan preferentemente sistemas de producción que usan células bacterianas. Se conocen sistemas de producción que usan células bacterianas incluyendo *Bacillus subtilis* así como *E. coli*, y pueden usarse preferentemente para producir anticuerpos de la presente invención.

Cuando se produce un anticuerpo usando una célula hospedadora de la presente invención, un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente invención puede expresarse cultivando la célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende el polinucleótido. El cultivo puede realizarse preferentemente de acuerdo con métodos conocidos. Por ejemplo, cuando se usan células animales como un hospedador, DMEM, MEM, RPMI 1640 o IMDM puede usarse preferentemente como el medio de cultivo. El medio de cultivo puede usarse preferentemente con soluciones de complemento de suero tales como FBS o suero de ternero fetal (FCS). Como alternativa, pueden cultivarse células en cultivos sin suero. El pH preferido es de aproximadamente 6 a 8 durante el transcurso del cultivo, aunque depende de la célula hospedadora. La incubación se lleva a cabo típicamente a aproximadamente 30 °C a 40 °C durante aproximadamente 15 a 200 horas. El medio se intercambia, airea o agita, según sea necesario.

Al mismo tiempo, como sistemas para producir anticuerpos *in vivo* pueden usarse preferentemente, por ejemplo, los que usan animales y los que usan plantas. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente invención se introduce en un animal o una planta para producir un anticuerpo de glipicano 3 en el cuerpo del animal o la planta, y después se recoge el anticuerpo. El "hospedador" de la presente invención incluye dichos animales y plantas.

Cuando se usan animales como un hospedador, están disponibles sistemas de producción que usan mamíferos o insectos. Pueden usarse preferentemente mamíferos tales como cabra, cerdo, oveja, ratón y vaca (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications (1993)). Cuando se usan mamíferos, pueden usarse animales transgénicos.

Por ejemplo, puede prepararse un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente invención como un gen de fusión con un gen que codifica un polipéptido producido específicamente en leche, tal como caseína β de la cabra. A continuación, se inyectan fragmentos polinucleotídicos que contienen este gen de fusión en embriones de cabra, que después se introducen de nuevo en cabras hembra. El anticuerpo de interés puede obtenerse de leche producida por las cabras transgénicas, que nacen de las cabras que recibieron los embriones, o por su descendencia. Pueden administrarse hormonas apropiadas a las cabras transgénicas para aumentar el volumen de leche que contiene el anticuerpo producido por las cabras transgénicas (Ebert *et al*, Bio/Technology (1994) 12: 699-702).

Pueden usarse insectos tales como gusanos de seda para producir anticuerpos de la presente invención. Cuando se usan gusanos de seda, pueden usarse baculovirus que portan un polinucleótido que codifica un anticuerpo de interés para infectar gusanos de seda, de modo que puede obtenerse un anticuerpo de glipicano 3 de interés de los fluidos corporales de estos gusanos de seda (Susumu *et al.*, Nature (1985) 315: 592-594).

Las plantas usadas para producir anticuerpos de la presente invención incluyen, por ejemplo, tabaco. Cuando se usa tabaco, se inserta un polinucleótido que codifica un anticuerpo de interés en un vector de expresión vegetal, por ejemplo, pMON 530, y después el vector se introduce en una bacteria tal como *Agrobacterium tumefaciens*. Las bacterias se usan después para infectar tabaco tal como *Nicotiana tabacum*, y el anticuerpo de glipicano 3 deseado puede obtenerse de las hojas infectadas del tabaco (Ma *et al*, Eur J. Immunol (1994) 24: 131-138). Como alternativa, las mismas bacterias pueden usarse para infectar *Lemna minor*, y después de clonar, el anticuerpo de glipicano 3 deseado puede obtenerse de las células infectadas de *Lemna minor* (Cox KM *et al*, Nat. Biotechnol. dic 2006; 24

(12): 1591-1597).

El anticuerpo obtenido de este modo puede aislarse del interior o el exterior (tal como el medio y la leche) de células hospedadoras, y purificarse como un anticuerpo sustancialmente puro y homogéneo. Los métodos usados para separar y purificar un anticuerpo no están limitados, y pueden aplicarse métodos usados en purificación de polipéptidos convencional. Los anticuerpos pueden aislarse y purificarse seleccionando o combinando apropiadamente, por ejemplo, columnas cromatográficas, filtración, ultrafiltración, precipitación por adición de sales, precipitación de disolvente, extracción de disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, isoelectroenfoque, diálisis, recristalización y similares.

Las cromatografías incluyen, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa y cromatografía de adsorción (Strategies for Protein Purification y Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak *et al.*, (1996) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Estas cromatografías pueden llevarse a cabo usando cromatografía de fase líquida tal como HPLC y FPLC. Los ejemplos de columnas para cromatografía de afinidad incluyen columnas de proteína A y columnas de proteína G. Los ejemplos de las columnas que usan proteína A incluyen Hyper D, POROS y Sepharose F. F. (Pharmacia).

Otra realización preferida de la presente divulgación incluye un método para producir un anticuerpo con farmacocinética en plasma controlada en la presente invención, en el que el método comprende las etapas de cultivar las células hospedadoras de la presente invención como se ha descrito anteriormente y recoger el anticuerpo de glipicano 3 del cultivo celular.

La presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden moléculas de segunda generación que son superiores al anticuerpo IgG1 anti receptor de IL-6 humanizado TOCILIZUMAB, y se han mejorado para mostrar eficacia farmacológica y conservación en plasma potenciadas, y por lo tanto producen un efecto terapéutico prolongado incluso cuando la frecuencia de administración se reduce. También se han mejorado para tener inmunogenicidad reducida y seguridad y propiedades físicas mejoradas, modificando secuencias de aminoácidos de las regiones variables y constantes de TOCILIZUMAB; y métodos para producir dichas composiciones farmacéuticas. La presente divulgación también proporciona regiones constantes de anticuerpo que son adecuadas para productos farmacéuticos.

La presente divulgación se refiere a anticuerpos anti receptor de IL-6 que muestran actividad de unión a antígeno superior, actividad neutralizante, conservación en plasma, estabilidad y/u homogeneidad, y riesgo de inmunogenicidad reducido.

Preferentemente, el anticuerpo anti receptor de IL-6 es un anticuerpo PM-1 humanizado (TOCILIZUMAB). Más específicamente, la presente divulgación proporciona anticuerpos PM-1 humanizados con actividad de unión a antígeno potenciada, anticuerpos PM-1 humanizados con actividad neutralizante potenciada, anticuerpos PM-1 humanizados que muestran conservación en plasma mejorada, anticuerpos PM-1 humanizados con riesgo de inmunogenicidad reducido, anticuerpos PM-1 humanizados con estabilidad mejorada y anticuerpos PM-1 humanizados con homogeneidad mejorada, todos los cuales se han conseguido mediante la sustitución de aminoácidos.

Los anticuerpos PM-1 humanizados se unen con el receptor de IL-6 humano, y por lo tanto inhiben la unión entre IL-6 humano y el receptor de IL-6 humano. En el presente documento, las SEQ ID en el listado de secuencias corresponden a las secuencias de aminoácidos de anticuerpos PM-1 humanizados mostrados posteriormente.

Secuencia de aminoácidos de cadena pesada: SEQ ID NO: 15

Secuencia de aminoácidos de cadena ligera: SEQ ID NO: 16

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada: SEQ ID NO: 17

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera: SEQ ID NO: 18

Secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada (HCDR1): SEQ ID NO: 1

Secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada (HCDR2): SEQ ID NO: 2

Secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada (HCDR3): SEQ ID NO: 3

Secuencia de aminoácidos de FR1 de cadena pesada (HFR1): SEQ ID NO: 7

Secuencia de aminoácidos de FR2 de cadena pesada (HFR2): SEQ ID NO: 8

Secuencia de aminoácidos de FR3 de cadena pesada (HFR3): SEQ ID NO: 9

Secuencia de aminoácidos de FR4 de cadena pesada (HFR4): SEQ ID NO: 10

Secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera (LCDR1): SEQ ID NO: 4

Secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera (LCDR2): SEQ ID NO: 5

Secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera (LCDR3): SEQ ID NO: 6

Secuencia de aminoácidos de FR1 de cadena ligera (LFR1): SEQ ID NO: 11

Secuencia de aminoácidos de FR2 de cadena ligera (LFR2): SEQ ID NO: 12

Secuencia de aminoácidos de FR3 de cadena ligera (LFR3): SEQ ID NO: 13

Secuencia de aminoácidos de FR4 de cadena ligera (LFR4): SEQ ID NO: 14

<Anticuerpos con afinidad potenciada y actividad neutralizante>

La presente divulgación proporciona anticuerpos anti receptor de IL-6 humano que muestran fuerte actividad de unión y/o neutralización de receptor de IL-6 humano. Más específicamente, la presente divulgación proporciona los siguientes anticuerpos de (a) a (y), y métodos para producir los anticuerpos:

(a) un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR1 de cadena pesada en la que Ser en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (HCDR1) se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Trp (RD_68), Thr (RD_37), Asp (RD_8), Asn (RD_11), Arg (RD_31), Val (RD_32), Phe (RD_33), Ala (RD_34), Gln (RD_35), Tyr (RD_36), Leu (RD_38), His (RD_42), Glu (RD_45) o Cys (RD_46).

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por Trp en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en SEQ ID NO: 26.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por Thr en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en SEQ ID NO: 27.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por Asp en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en SEQ ID NO: 28.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por Asn en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en SEQ ID NO: 29.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por Arg en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en SEQ ID NO: 30.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por Val en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en SEQ ID NO: 31.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por Phe en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en SEQ ID NO: 32.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por Ala en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en SEQ ID NO: 33.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por Gln en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en SEQ ID NO: 34.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por Tyr en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en SEQ ID NO: 35.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por Leu en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en SEQ ID NO: 36.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por His en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en SEQ ID NO: 37.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por Glu en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en SEQ ID NO: 38.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por Cys en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en SEQ ID NO: 39.

(b) un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR1 de cadena pesada en la que Trp en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (HCDR1) se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución a Ile (RD_9) o Val (R_30).

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Trp por Ile en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en SEQ ID NO: 40.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Trp por Val en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en SEQ ID NO: 41.

(c) un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR2 de cadena pesada en la que Tyr en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (HCDR2) se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácidos después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la

sustitución a Phe (RD_82).

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Tyr por Phe en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en SEQ ID NO: 42.

(d) un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR2 de cadena pesada en la que Thr en la posición 8 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (HCDR2) se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácidos después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución a Arg (RD_79).

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Thr por Arg en la posición 8 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en SEQ ID NO: 43.

(e) un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR2 de cadena pesada en la que Thr en la posición 9 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (HCDR2) se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución a Ser (RD_12) o Asn (RD_61).

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Thr por Ser en la posición 9 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en SEQ ID NO: 44.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Thr por Asn en la posición 9 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en SEQ ID NO: 45.

(f) un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR3 de cadena pesada en la que Ser en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (HCDR3) se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución a Ile (RD_2), Val (RD_4), Thr (RD_80) o Leu (RD_5).

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por Ile en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 46.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por Val en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 47.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por Thr en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 48.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por Leu en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 49.

(g) un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR3 de cadena pesada en la que Leu en la posición 2 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (HCDR3) se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución a Thr (RD_84).

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Leu por Thr en la posición 2 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 50.

(h) un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR3 de cadena pesada en la que Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (HCDR3) se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución a Ala (RD_3) o Ile (RD_83). Además, también se prefiere la sustitución de Thr por Ser (RDC_14H) en la posición 5.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Thr por Ala en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 51.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Thr por Ile en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 52.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Thr por Ser en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 53.

(i) un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR3 de cadena pesada en la que Ala en la posición 7 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (HCDR3) se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución a Ser (RD_81) o Val (PF_3H).

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ala por Ser en la posición 7 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 54.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ala por Val en la posición 7 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 55.

(j) un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR3 de cadena pesada en la que Met en la posición 8 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (HCDR3) se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución a Leu (PF_4H).

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Met por Leu en la posición 8 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 56.

(k) un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR3 de cadena pesada en la que Ser en la posición 1 y Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (HCDR3) se han sustituido con otros aminoácidos.

5 El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado, sin embargo, se prefieren sustituciones de Ser por Leu en la posición 1 y Thr por Ala en la posición 5 (RD_6). Otras sustituciones preferidas incluyen: sustituciones de Ser por Val en la posición 1 y Thr por Ala en la posición 5 (RDC_2H); sustituciones de Ser por Ile en la posición 1 y Thr por Ala en la posición 5 (RDC_3H); sustituciones de Ser por Thr en la posición 1 y Thr por Ala en la posición 5 (RDC_4H); sustituciones de Ser por Val en la posición 1 y Thr por Ile en la posición 5 (RDC_5H); sustituciones de Ser por Ile en la posición 1 y Thr por Ile en la posición 5 (RDC_6H); sustituciones de Ser por Thr en la posición 1 y Thr por Ile en la posición 5 (RDC_7H); y sustituciones de Ser por Leu en la posición 1 y Thr por Ile en la posición 5 (RDC_8H).

15 Se muestra una secuencia resultante de las sustituciones de Ser por Leu en la posición 1 y Thr por Ala en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 57.

Se muestra una secuencia resultante de las sustituciones de Ser por Val en la posición 1 y Thr por Ala en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 58.

20 Se muestra una secuencia resultante de las sustituciones de Ser por Ile en la posición 1 y Thr por Ala en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 59.

Se muestra una secuencia resultante de las sustituciones de Ser por Thr en la posición 1 y Thr por Ala en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 60.

25 Se muestra una secuencia resultante de las sustituciones de Ser por Val en la posición 1 y Thr por Ile en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 61.

30 Se muestra una secuencia resultante de las sustituciones de Ser por Ile en la posición 1 y Thr por Ile en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 62.

Se muestra una secuencia resultante de las sustituciones de Ser por Thr en la posición 1 y Thr por Ile en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 63.

35 Se muestra una secuencia resultante de las sustituciones de Ser por Leu en la posición 1 y Thr por Ile en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 64. (1) Un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR3 de cadena pesada en la que Leu en la posición 2, Ala en la posición 7 y Met en la posición 8 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (HCDR3) se han sustituido con otros aminoácidos.

40 El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo se prefieren sustituciones de Leu por Thr en la posición 2, Ala por Val en la posición 7 y Met por Leu en la posición 8 (RD_78).

45 Se muestra una secuencia resultante de las sustituciones de Leu por Thr en la posición 2, Ala por Val en la posición 7 y Met por Leu en la posición 8 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en SEQ ID NO: 65. (m) Un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR1 de cadena ligera en la que Arg en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (LCDR1) se ha sustituido con otro aminoácido.

50 El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución a Phe (RD_18).

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Arg por Phe en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 en SEQ ID NO: 66.

55 (n) Un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR1 de cadena ligera en la que Gln en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (LCDR1) se ha sustituido con otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución a Arg (RD_26) o Thr (RD_20).

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Gln por Arg en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 en SEQ ID NO: 67.

60 Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Gln por Thr en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 en SEQ ID NO: 68.

(o) Un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR1 de cadena ligera en la que Tyr en la posición 9 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (LCDR1) se ha sustituido con otro aminoácido.

65 El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución a Phe (RD_73).

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Tyr por Phe en la posición 9 en la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 4 en SEQ ID NO: 69.

(p) Un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR1 de cadena ligera en la que Asn en la posición 11 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (LCDR1) se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución a Ser (RD_27).

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Asn por Ser en la posición 11 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 en SEQ ID NO: 70.

(q) Un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR2 de cadena ligera en la que Thr en la posición 2 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (LCDR2) se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución a Gly.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Thr por Gly en la posición 2 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 en SEQ ID NO: 71.

(r) Un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR3 de cadena ligera en la que Gln en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (LCDR3) se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución a Gly (RD_28), Asn (RD_29) o Ser (RDC_15L).

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Gln por Gly en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 en SEQ ID NO: 72.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Gln por Asn en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 en SEQ ID NO: 73.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Gln por Ser en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 en SEQ ID NO: 74.

(s) Un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR3 de cadena ligera en la que Gly en la posición 3 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución a Ser.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Gly por Ser en la posición 3 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 en SEQ ID NO: 75.

(t) Un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR1 de cadena ligera en la que Tyr en la posición 9 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (LCDR1) se ha sustituido con otro aminoácido, y una CDR3 de cadena ligera en la que Gly en la posición 3 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (LCDR3) se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, Tyr en la posición 9 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (LCDR1) se sustituye preferentemente con Phe, mientras que Gly en la posición 3 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (LCDR3) se sustituye preferentemente con Ser (RD_72).

(u) Un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR3 de cadena ligera en la que Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (LCDR3) se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Arg (RD_23) o Ser.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Thr por Arg en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 en SEQ ID NO: 76.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Thr por Ser en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 en SEQ ID NO: 77.

(v) Un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR3 de cadena ligera en la que Gln en la posición 1 y Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (LCDR3) se han sustituido con otros aminoácidos.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren sustituciones de Gln por Gly en la posición 1 y Thr por Ser en la posición 5 (RD_22). Otras sustituciones preferidas incluyen sustituciones de Gln por Gly en la posición 1 y Thr por Arg en la posición 5 (RDC_11L).

Se muestra una secuencia resultante de las sustituciones de Gln por Gly en la posición 1 y Thr por Ser en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 en SEQ ID NO: 78.

Se muestra una secuencia resultante de las sustituciones de Gln por Gly en la posición 1 y Thr por Arg en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 en SEQ ID NO: 79.

(w) Un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano que comprende una CDR2 de cadena pesada en la que Thr en la posición 9 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (HCDR2) se ha sustituido con otro aminoácido, y una CDR3 de cadena pesada en la que Ser en la posición 1 y Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (HCDR3) se han sustituido con otros aminoácidos.

Thr en la posición 9 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (HCDR2) se reemplaza preferentemente con Asn. Además, las combinaciones preferidas de aminoácidos para las sustituciones de Ser en la posición 1 y Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (HCDR3) incluyen: Leu y Ala (RDC_27H);

Val y Ala (RDC_28H); Ile y Ala (RDC_30H); Thr y Ala (RDG_4H); Val e Ile (RDC_29H); Ile e Ile (RDC_32H); Thr e Ile (RDC_7H); y Leu e Ile (RDC_8H).

(x) Un anticuerpo que comprende una región variable que comprende la CDR3 de cadena pesada de (k) y una región variable que comprende la CDR3 de cadena ligera de (v).

(y) El anticuerpo de (x), que comprende además la CDR2 de cadena pesada de (e).

La presente divulgación proporciona anticuerpos que comprenden al menos la sustitución de aminoácidos de una cualquiera de (a) a (y) descritas anteriormente y métodos para producir los anticuerpos. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente divulgación también pueden comprender otras sustituciones de aminoácidos además de la sustitución de aminoácido de una cualquiera de (a) a (y) descritas anteriormente. Además, los anticuerpos de la presente divulgación también incluyen anticuerpos que comprenden una combinación de cualquier sustitución de aminoácidos de (a) a (y) descritas anteriormente. Las sustituciones de aminoácidos de (a) a (y) descritas anteriormente incluyen sustituciones de las secuencias de aminoácidos de CDR descritas anteriormente a otros aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos distintas de las de (a) a (y) descritas anteriormente incluyen, por ejemplo, sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de secuencias de aminoácidos en otras regiones CDR. Dichas sustituciones también incluyen sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de secuencias de aminoácidos en las regiones FR. Dichas sustituciones incluyen además sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones en las regiones constantes.

Además, los anticuerpos de la presente divulgación también incluyen anticuerpos en los que se injerta una CDR de alta afinidad descubierta en la presente descripción en cualquier marco conservado distinto de un anticuerpo PM-1 humanizado. Los anticuerpos de la presente divulgación también incluyen anticuerpos en los que la pérdida de afinidad como resultado de injerto de una CDR de alta afinidad descubierta en la presente divulgación en cualquier marco conservado distinto de un anticuerpo PM-1 humanizado se ha compensado por mutaciones introducidas en la FR para restaurar la afinidad original (véase, por ejemplo, Curr. Opin. Biotechnol. Ago 1994; 5(4): 428-33), y anticuerpos en los que la pérdida se ha compensado por mutaciones introducidas en la región CDR para restaurar la afinidad original (véase, por ejemplo, documento US 2006/0122377).

En la presente divulgación la sustitución de aminoácidos de una cualquiera de (a) a (y) descritas anteriormente se introduce preferentemente en un anticuerpo PM-1 humanizado. Los anticuerpos PM-1 humanizados introducidos con la sustitución de aminoácidos de una cualquiera de (a) a (y) descritas anteriormente tienen fuerte actividad neutralizante de receptor de IL-6. Los anticuerpos PM-1 humanizados introducidos con la sustitución de aminoácidos de una cualquiera de (a) a (y) descritas anteriormente son eficaces como agentes terapéuticos para enfermedades inflamatorias asociadas con IL-6 tales como artritis reumatoide.

Los anticuerpos que comprenden la sustitución de aminoácidos de una cualquiera de (a) a (y) descritas anteriormente también pueden denominarse, por ejemplo, (1) o (2) descritos posteriormente. Un ejemplo de anticuerpo que comprende la sustitución de (a) se describe en el presente documento; otros anticuerpos que comprenden la sustitución de una cualquiera de (b) a (y) también pueden denominarse de la misma manera.

(1) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos en la que Ser en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 se ha sustituido con otro aminoácido

(2) Un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos en la que Ser en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 se ha sustituido con otro aminoácido.

<Anticuerpos con actividad de unión potenciada>

La presente divulgación proporciona además anticuerpos anti receptor de IL-6 con fuerte actividad de unión a receptor de IL-6. En el presente documento, los "anticuerpos anti receptor de IL-6 con fuerte actividad de unión a receptor de IL-6" típicamente se refieren a anticuerpos cuya afinidad se ha medido que es 1 nM o menor a 37 °C en condiciones fisiológicas, preferentemente 0,1 nM o menor, y más preferentemente 0,04 nM o menor. Se supone que dichos anticuerpos anti receptor de IL-6 con fuerte actividad de unión al receptor de IL-6 tienen una actividad potenciada de neutralización de la actividad biológica del antígeno.

No existe limitación del tipo de sustituciones de aminoácidos introducidas en los anticuerpos anti receptor IL-6 de la presente divulgación con fuerte actividad de unión al receptor de IL-6. Dichas sustituciones de aminoácidos incluyen, por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos descritas anteriormente.

El tipo de receptor de IL-6 no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere el receptor de IL-6 humano.

La actividad de unión puede determinarse por métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, usando Biacore o similares, basándose en resonancia de plasma superficial (SPR).

<Anticuerpos que tienen una secuencia de CDR con riesgo de inmunogenicidad reducido>

La presente divulgación también proporciona anticuerpos anti receptor de IL-6 con inmunogenicidad reducida, en particular, anticuerpos PM-1 humanizados. Se supone que la inmunogenicidad se potencia cuando la secuencia de un anticuerpo contiene un epítipo de linfocitos T que se une con HLA. Por lo tanto, el riesgo de inmunogenicidad para un anticuerpo puede reducirse retirando el epítipo de linfocitos T de la secuencia de anticuerpo mediante sustitución de secuencias.

La presente divulgación proporciona regiones variables de cadena ligera de anticuerpos anti receptor de IL-6 humano humanizados con inmunogenicidad reducida, en particular, los de anticuerpos PM-1 humanizados, de los que se han retirado epítopos de linfocitos T mediante sustitución de otros aminoácidos en las secuencias de aminoácidos de anticuerpo, en particular, secuencias de CDR. La presente divulgación también proporciona anticuerpos que comprenden dichas regiones variables de cadena ligera.

Más específicamente, la presente divulgación proporciona CDR2 de cadena ligera en la que Thr en la posición 2 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (LCDR2) se ha sustituido con otro aminoácido. La presente divulgación también proporciona regiones variables de cadena ligera que comprenden dicha CDR2 de cadena ligera. La presente divulgación también proporciona anticuerpos anti receptor de IL-6 que comprenden dicha región variable de cadena ligera. La secuencia de aminoácidos después de sustitución no está particularmente limitada; sin embargo, se prefiere sustitución a Gly. Se muestran una secuencia que comprende la sustitución de Thr por Gly en la posición 2 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 en SEQ ID NO: 71. La sustitución de aminoácidos se introduce preferentemente en una región variable de cadena ligera de un anticuerpo PM-1 humanizado.

<FR y CDR de H53/L28>

La presente divulgación también proporciona anticuerpos anti receptor de IL-6 humano con farmacocinética en plasma mejorada, estabilidad aumentada y/o inmunogenicidad reducida. Se ha descubierto que las semividas de IgG que comparten el mismo dominio Fc en plasma están correlacionadas con los puntos isoeléctricos con un alto coeficiente de correlación. Después, los presentes inventores intentaron modificar los puntos isoeléctricos de las regiones variables de dos anticuerpos contra diferentes antígenos, y controlaron con éxito sus semividas en plasma sin modificar sus dominios Fc independientemente de la especificidad de antígeno. Se supuso que la tasa de captación de anticuerpos no específicos por células endoteliales dependía de la interacción de Coulomb fisicoquímica entre IgG y la superficie celular con carga negativa. La reducción del punto isoeléctrico de IgG altera la interacción de Coulomb, lo que reduce la captación no específica por células endoteliales y, como resultado, el metabolismo en células endoteliales se reduce. Esto puede prolongar la conservación en plasma.

Específicamente, la presente divulgación proporciona anticuerpos anti receptor de IL-6 humano con punto isoeléctrico reducido y conservación en plasma mejorada, sustituyendo aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti receptor de IL-6, en particular, un anticuerpo PM-1 humanizado. Específicamente, el anticuerpo PM-1 se modifica para reducir su punto isoeléctrico sustituyendo otros aminoácidos en H13 (aminoácido en la posición 13 en SEQ ID NO: 7), H16 (aminoácido en la posición 16 en SEQ ID NO: 7), H43 (aminoácido en la posición 8 en SEQ ID NO: 8), H81 (aminoácido en la posición 16 en SEQ ID NO: 9), H105 (aminoácido en la posición 3 en SEQ ID NO: 10), L18 (aminoácido en la posición 18 en SEQ ID NO: 11), L45 (aminoácido en la posición 11 en SEQ ID NO: 12), L79 (aminoácido en la posición 23 en SEQ ID NO: 13), L107 (aminoácido en la posición 10 en SEQ ID NO: 14), H31 (aminoácido en la posición 1 en SEQ ID NO: 1), L24 (aminoácido en la posición 1 en SEQ ID NO: 4) y/o L53 (aminoácido en la posición 4 en SEQ ID NO: 5), numeración de Kabat (Kabat EA *et al.*, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH). Estas sustituciones pueden reducir el punto isoeléctrico de un anticuerpo PM-1 humanizado sin afectar a su actividad y estabilidad de unión. Algunos restos de aminoácidos originados de la secuencia de ratón permanecen sin sustitución en el anticuerpo PM-1 humanizado para mantener su actividad de unión incluso después de la humanización de la secuencia de ratón. Más específicamente, los aminoácidos en H27 (aminoácido en la posición 27 de SEQ ID NO: 7), H28 (aminoácido en la posición 28 en SEQ ID NO: 7), H29 (aminoácido en la posición 29 en SEQ ID NO: 7), H30 (aminoácido en la posición 30 en SEQ ID NO: 7) y H71 en el anticuerpo PM-1 humanizado (las exposiciones se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat descrito anteriormente) son de la secuencia de ratón. HFR1 puede convertirse a una secuencia humana sustituyendo H13, H16, H23 y H30, lo que permite producir un anticuerpo cuyo riesgo de inmunogenicidad es menor que el del anticuerpo PM-1 humanizado. Además, ya que el anticuerpo PM-1 humanizado es un anticuerpo humanizado mediante injertos de CDR, su estabilidad puede mejorarse adicionalmente. Los anticuerpos pueden estabilizarse, por ejemplo, sustituyendo restos de aminoácidos expuestos en la superficie de la región variable de anticuerpo por aminoácidos hidrófilos. Como alternativa, los anticuerpos también pueden estabilizarse modificando la secuencia de CDR a una secuencia consenso. El anticuerpo PM-1 humanizado puede estabilizarse mediante una sustitución de Met por Ile en H69 (posición de aminoácido 4 de SEQ ID NO: 9) (estabilización del núcleo hidrófobo), Leu por Ser en H70 (aminoácido en la posición 5 en SEQ ID NO: 9) (conversión del resto expuesto en superficie a un resto hidrófilo), Thr por Asn en H58 (aminoácido en la posición 9 SEQ ID NO: 2) (modificación de la CDR2 de cadena pesada a una secuencia consenso), Ser por Gly en H65 (aminoácido en la posición 16 en SEQ ID NO: 2) (sustitución de Gly en la región de vuelta P y modificación de CDR2 de cadena pesada a una secuencia consenso) o Thr por Ser en L93 (aminoácido en la posición 5 en SEQ ID NO: 6)

(conversión del resto expuesto en superficie a un resto hidrófilo) (las exposiciones se numeran de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat descrito anteriormente).

Como alternativa, los epítopos de linfocitos T predichos por ordenador pueden retirarse sustituyendo Thr por Gly en L51 en la posición 2 en LCDR2 (SEQ ID NO: 5) descrita anteriormente, y esto puede reducir el riesgo de inmunogenicidad sin afectar a la actividad y estabilidad de unión. Pueden obtenerse anticuerpos anti receptor de IL-6 con estabilidad y farmacocinética en plasma de anticuerpo mejoradas, así como inmunogenicidad reducida usando estas sustituciones de aminoácidos en combinación.

Dichos anticuerpos incluyen, por ejemplo, los anticuerpos de (1) a (37) posteriores.

(1) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR1 en la que Arg en la posición 13 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Lys.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Arg por Lys en la posición 13 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 en SEQ ID NO: 80.

(2) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR1 en la que Gln en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Glu.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Gln por Glu en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 en SEQ ID NO: 81.

(3) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR1 en la que Thr en la posición 23 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Ala.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Thr por Ala en la posición 23 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 en SEQ ID NO: 82.

(4) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR1 en la que Thr en la posición 30 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Ser.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Thr por Ser en la posición 30 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 en SEQ ID NO: 83.

(5) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR1 en la que Arg en la posición 13, Gln en la posición 16, Thr en la posición 23 y Thr en la posición 30 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 se han sustituido con otros aminoácidos.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren sustituciones de Arg por Lys en la posición 13, Gln por Glu en la posición 16, Thr por Ala en la posición 23 y Thr por Ser en la posición 30.

Se muestra una secuencia resultante de las sustituciones de Arg por Lys en la posición 13, Gln por Glu en la posición 16, Thr por Ala en la posición 23 y Thr por Ser en la posición 30 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 en SEQ ID NO: 84.

(6) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR2 en la que Arg en la posición 8 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Glu.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Arg por Glu en la posición 8 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 en SEQ ID NO: 85.

(7) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR3 en la que Met en la posición 30 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Ile.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Met por Ile en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 en SEQ ID NO: 86.

(8) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR3 en la que Leu en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Ser.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Leu por Ser en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 en SEQ ID NO: 87.

(9) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR3 en la que Arg en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Lys.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Arg por Lys en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 en SEQ ID NO: 88.

(10) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR3 en la que Val en la posición 27 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Ala.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Val por Ala en la posición 27 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 en SEQ ID NO: 89.

(11) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR3 en la que Met en la posición 4, Leu en la posición 5, Arg en la posición 16 y Val en la posición 27 en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 (HFR3) se han sustituido con otros aminoácidos.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren sustituciones de Met por Ile en la posición 4, Leu por Ser en la posición 5, Arg por Lys en la posición 16 y Val por Ala en la posición 27.

Se muestra una secuencia resultante de las sustituciones de Met por Ile en la posición 4, Leu por Ser en la posición 5, Arg por Lys en la posición 16 y Val por Ala en la posición 27 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 en SEQ ID NO: 90.

(12) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR4 en la que Gln en la posición 3 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 (HCR4) se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Glu.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Gln por Glu en la posición 3 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 en SEQ ID NO: 91.

(13) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR1 en la que Arg en la posición 18 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 (LFR1) se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Ser.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Arg por Ser en la posición 18 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 en SEQ ID NO: 92.

(14) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR2 en la que Lys en la posición 11 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 (LFR2) se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Glu.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Glu por Lys en la posición 11 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 en SEQ ID NO: 93.

(15) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR3 en la que Gln en la posición 23 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Glu.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Gln por Glu en la posición 23 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 en SEQ ID NO: 94.

(16) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende FR3 en la que Pro en la posición 24 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Ala.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Pro por Ala en la posición 24 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 en SEQ ID NO: 95.

(17) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende FR3 en la que Ile en la posición 27 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Ala.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ile por Ala en la posición 27 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 en SEQ ID NO: 96.

(18) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende FR3 en la que Gln en la posición 423, Pro en la posición 24 e Ile en la posición 27 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (LFR3) se han sustituido con otros aminoácidos.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren sustituciones de Gln por Glu en la posición 23, Pro por Ala en la posición 24 e Ile por Ala en la posición 27.

Se muestra una secuencia resultante de las sustituciones de Gln por Glu en la posición 23, Pro por Ala en la posición 24, Ile por Ala en la posición 27 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 en SEQ ID NO: 97.

(19) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende FR4 en la que Lys en la posición 10 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 (LFR4) se ha sustituido con otro aminoácido.

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Glu.

Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Lys por Glu en la posición 10 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 en SEQ ID NO: 98.

- (20) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR4 en la que Ser en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 (HFR4) se ha sustituido con otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Thr.
- 5 Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 en SEQ ID NO: 132.
- (21) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende FR4 en la que Gln en la posición 3 y Ser en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 (HFR4) se han sustituido con otros aminoácidos.
- 10 El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren sustituciones de Gln por Glu en la posición 3 y Ser por Thr en la posición 5. Se muestra una secuencia resultante de las sustituciones de Gln por Glu en la posición 3 y Ser por Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 en SEQ ID NO: 133.
- 15 (22) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo PM-1 humanizado que comprende las sustituciones de aminoácidos de (5), (6), (11) y (21).
- (23) A Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada de un anticuerpo PM-1 humanizado que comprende las sustituciones de aminoácidos de (13), (14), (18) y (19).
- (24) Un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada de (22) y la región variable de cadena ligera de (23).
- 20 (25) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 en la que Ser en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (HCDR1) se ha sustituido con otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución de Asp.
- 25 Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por Asp en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 en SEQ ID NO: 28.
- (26) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR2 en la que Ser en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 se ha sustituido con otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución de Gly.
- 30 Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Ser por Gly en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en SEQ ID NO: 99.
- (27) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR2 en la que Thr en la posición 9 y Ser en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (HCDR2) se ha sustituido con otros aminoácidos.
- 35 El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren sustituciones de Thr por Asn en la posición 9 y Ser por Gly en la posición 16. Se muestra una secuencia resultante de las sustituciones de Thr por Asn en la posición 9 y Ser por Gly en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en SEQ ID NO: 100.
- 40 (28) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 en la que Arg en la posición 1 y Ser en la posición 4 (LCDR1) se ha sustituido con otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución de Gln. Se muestra una secuencia resultante de las sustituciones de Arg por Gln en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 en SEQ ID NO: 101.
- 45 (29) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR2 en la que Arg en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 se ha sustituido con otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución de Glu.
- 50 Se muestra una secuencia resultante de las sustituciones de Arg por Glu en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 en SEQ ID NO: 102.
- (30) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR2 en la que Thr en la posición 2 y Arg en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (LCDR2) se han sustituido con otros aminoácidos.
- 55 El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren sustituciones de Thr por Gly en la posición 2 y Arg por Glu en la posición 4. Se muestra una secuencia resultante de las sustituciones de Thr por Gly en la posición 2 y Arg por Glu en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 en SEQ ID NO: 103.
- 60 (31) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR3 en la que Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (LCDR3) se ha sustituido con otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustituciones a Ser. Se muestra una secuencia resultante de la sustitución de Thr por Ser en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 en SEQ ID NO: 77.
- 65 (32) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende las sustituciones de aminoácidos de (25) y (27).

(33) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende las sustituciones de aminoácidos de (28), (30) y (31).

(34) Un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada de (32) y la región variable de cadena ligera de (33).

(35) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104 (región variable de cadena pesada de H53/L28).

(36) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105 (región variable de cadena pesada de H53/L28).

(37) Un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada de (35) y la región variable de cadena ligera de (36).

Cualquier sustitución de aminoácidos de (1) a (37) descritas anteriormente se introduce preferentemente en un anticuerpo PM-1 humanizado. La presente divulgación proporciona anticuerpos que comprenden al menos la sustitución de aminoácidos de una cualquiera de (1) a (37) descritas anteriormente y métodos para producir esos anticuerpos. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente divulgación también incluyen anticuerpos que comprenden otras sustituciones de aminoácidos además de la sustitución de aminoácidos de una cualquiera de (1) a (37) descritas anteriormente. Los anticuerpos de la presente divulgación también incluyen anticuerpos que comprenden combinaciones de múltiples sustituciones de aminoácidos de (1) a (37) descritas anteriormente. Las sustituciones de aminoácidos de (1) a (37) descritas anteriormente incluyen, por ejemplo, sustituciones en las secuencias de aminoácidos de FR y CDR descritas anteriormente. Las sustituciones de aminoácidos distintas de las de (1) a (37) descritas anteriormente incluyen otras sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones en secuencias de FR y CDR distintas de las descritas anteriormente. Las sustituciones de aminoácidos también incluyen sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones en las secuencias de aminoácidos de regiones constantes.

Adicionalmente, además de las descritas anteriormente, las modificaciones de aminoácidos que dan como resultado un punto isoelectrico menor sin pérdida de la actividad de anticuerpo anti receptor de IL-6 incluyen, por ejemplo, sustituciones de Lys en la posición 15 y/o Ser en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 con otros aminoácidos. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren sustituciones de Lys por Gln en la posición 15 y Ser por Asp en la posición 16. Se muestra una secuencia que comprende las sustituciones de Lys por Gln en la posición 15 y Ser por Asp en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en SEQ ID NO: 121. Como alternativa, dichas sustituciones de aminoácidos también pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100. Se muestra una secuencia que comprende las sustituciones de Lys por Gln en la posición 15 y Gly por Asp en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100 en SEQ ID NO: 122. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende CDR2 en la que Lys en la posición 15 y/o Ser en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 100 se han sustituido con otros aminoácidos.

Otras modificaciones que dan como resultado un punto isoelectrico inferior incluye sustitución de Gln en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 que se ha sustituido con otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere a sustitución a Glu. Se muestra una secuencia de aminoácidos que comprende la sustitución de Gln por Glu en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 en SEQ ID NO: 123. Como alternativa, esta sustitución de aminoácidos también puede introducirse en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101. Se muestra una secuencia de aminoácidos que comprende la sustitución de Gln por Glu en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101 en SEQ ID NO: 124. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona anticuerpos que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 en la que Gln en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o 101 se ha sustituido con otro aminoácido.

Otras modificaciones que darán como resultado un punto isoelectrico menor incluyen sustitución de His en la posición 6 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 con otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado, sin embargo, se prefiere sustitución a Glu. Se muestra una secuencia de aminoácidos que comprende la sustitución de His por Glu en la posición 6 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 en SEQ ID NO: 125. Como alternativa, esta sustitución de aminoácidos también puede introducirse en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103. Se muestra una secuencia de aminoácidos que comprende la sustitución de His por Glu en la posición 6 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103 en SEQ ID NO: 126. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona anticuerpos que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende CDR2 en la que His en la posición 6 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o 103 se ha sustituido con otro aminoácido.

Además, las modificaciones que dan como resultado riesgo de inmunogenicidad reducido incluyen sustitución de Ala por Val en la posición 27 (H89, numeración de Kabat) en la secuencia de aminoácidos de FR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 90. Se muestra una secuencia de aminoácidos que comprende la sustitución de Ala por Val en la posición 27 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90 en SEQ ID NO: 127. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende FR3 en la que Ala se ha sustituido por Val en la posición 27 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90.

La única secuencia de ratón que permanece en las secuencias de aminoácidos de FR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 9 y 90 es Arg en la posición 6 (H71, numeración de Kabat). Pueden producirse anticuerpos anti receptor de IL-6 humano que tienen un marco conservado que consiste únicamente en secuencias humanas usando como una secuencia de FR3, la secuencia humana de subclase VH1 humana (SEQ ID NO: 128) o subclase VH3 humana (SEQ ID NO: 129) en la que Arg está conservada en H71. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende la FR3 de SEQ ID NO: 128 o 129.

Además, las modificaciones que mejoran la estabilidad incluyen sustitución de Ser por Ile en la posición 5 (H107, numeración de Kabat) en la secuencia de aminoácidos de FR4 de cadena pesada de SEQ ID NO: 10. Se muestra una secuencia de aminoácidos que comprende la sustitución de Ser por Ile en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 en SEQ ID NO: 130. Como alternativa, esta secuencia de aminoácidos puede introducirse también en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91. Se muestra una secuencia de aminoácidos que comprende la sustitución de Ser por Ile en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91 en SEQ ID NO: 131. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende FR4 en la que Ser se ha sustituido por Ile en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o 91.

Dichas sustituciones de aminoácidos se introducen preferentemente en el anticuerpo PM-1 humanizado, H53/L28 (un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 104 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 105), o anticuerpo PF1 (un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 22 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 23). La presente divulgación proporciona anticuerpos que comprenden al menos dichas sustituciones de aminoácidos y métodos para producir los anticuerpos. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente divulgación incluyen anticuerpos que comprenden, además de dichas sustituciones de aminoácidos, la sustitución de aminoácidos de una cualquiera de (1) a (37) descritas anteriormente y/u otras sustituciones de aminoácidos distintas de las de (1) a (37) descritas anteriormente. Las sustituciones de aminoácidos distintas de las de (1) a (37) descritas anteriormente incluyen otras sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones en secuencias de FR y CDR distintas de las descritas anteriormente. Las sustituciones de aminoácidos también incluyen sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones en las secuencias de aminoácidos de regiones constantes.

<Anticuerpos anti receptor de IL-6 humano con punto isoelectrico bajo>

La presente divulgación también proporciona anticuerpos anti receptor de IL-6 con un punto isoelectrico bajo. Los anticuerpos de la presente divulgación con punto isoelectrico bajo incluyen anticuerpos en los que el punto isoelectrico medido del anticuerpo completo es bajo y anticuerpos en los que el punto isoelectrico teórico de la región variable (VH/VL) es bajo.

En el presente documento, los "anticuerpos anti receptor de IL-6 en los que el punto isoelectrico medido del anticuerpo completo es bajo" típicamente se refieren a anticuerpos en los que el punto isoelectrico medido es 7,5 o menor, preferentemente 7,0 o menor y más preferentemente 6,0 o menor. El punto isoelectrico medido puede determinarse por métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, isoelectroenfoque en gel sin desnaturalización o isoelectroenfoque capilar.

En el presente documento, los "anticuerpos anti receptor de IL-6 en los que el punto isoelectrico teórico de la región variable es bajo" típicamente se refieren a anticuerpos en los que el punto isoelectrico teórico es 5,5 o menor, preferentemente 5,0 o menor y más preferentemente 4,0 o menor. El punto isoelectrico teórico puede determinarse por métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, los puntos isoelectricos teóricos de región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera de una región variable pueden calcularse usando software tal como GENETYX (GENETYX CORPORATION).

No existe limitación sobre el tipo de sustitución de aminoácido para introducir para obtener anticuerpos anti receptor de IL-6 de la presente divulgación con punto isoelectrico bajo. Dichas sustituciones de aminoácidos incluyen, por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos descritas anteriormente. Se supone que dichos anticuerpos anti receptor de IL-6 con punto isoelectrico bajo muestran conservación en plasma prolongada.

El tipo de receptor de IL-6 no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere receptor de IL-6 humano.

<Anticuerpos anti receptor de IL-6 humano que son estables a altas concentraciones>

Además, la presente divulgación proporciona anticuerpos anti receptor de IL-6 que son estables a altas concentraciones.

En el presente documento, "estable a altas concentraciones" significa que el aumento de la proporción de agregados de anticuerpos anti receptor de IL-6 ([área pico para agregado en cromatograma de filtración en gel]/[área pico total en cromatograma de filtración en gel] x 100) generado en una solución de anticuerpo de alta concentración

(100 mg/ml) a 25 °C en un mes es de 0,3 % o menor, preferentemente 0,2 % o menor y más preferentemente 0,1 % o menor cuando el anticuerpo está en un tampón de pH 6,5 a 7,0 seleccionado apropiadamente para administración subcutánea, por ejemplo, histidina-HCl 20 mM, NaCl 150 mM. La concentración de anticuerpo anti receptor de IL-6 puede ser 100 mg/ml o mayor, por ejemplo, 200 o 300 mg/ml.

5 No existe limitación sobre los anticuerpos anti receptor de IL-6 de la presente divulgación que son estables a altas concentraciones. Los anticuerpos pueden prepararse, por ejemplo, con las sustituciones de aminoácidos descritas anteriormente o similares.

10 El tipo de receptor de IL-6 no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere receptor de IL-6 humano.

La presente divulgación también proporciona anticuerpos PM-1 humanizados que comprenden una cualquiera de las sustituciones de aminoácidos de (1) a (37) descritas anteriormente y que comprenden además cualquiera de las sustituciones de aminoácidos de (a) a (y) descritas anteriormente para mejorar su actividad de unión y/o actividad neutralizante. En una realización, dichos anticuerpos incluyen los que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 (PF1_H) y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 (PF1_L) (PF1), pero sin limitación a los mismos.

20 Además, la presente divulgación proporciona anticuerpos anti receptor de IL-6 de cualquiera de las siguientes:

(A) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 165 (CDR1 de VHS-M83), CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 166 (CDR2 de VH5-M83) y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 167 (CDR3 de VH5-M83);

(B) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101 (CDR1 de VL5), CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 168 (CDR2 de VL5) y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 (CDR3 de VL5);

(C) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada de (A) y la región variable de cadena ligera de (B);

(D) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 169 (CDR1 de VH3-M73), CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 170 (CDR2 de VH3-M73) y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171 (CDR3 de VH3-M73);

(E) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 172 (CDR1 de VL3), CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173 (CDR2 de VL3) y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 (CDR3 de VL3);

(F) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada de (D) y la región variable de cadena ligera de (E);

(G) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 169 (CDR1 de VH4-M73), CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174 (CDR2 de VH4-M73) y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171 (CDR3 de VH4-M73);

(H) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 175 (CDR1 de VL1), CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173 (CDR2 de VL1) y CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 (CDR3 de VL1); y

(I) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada de (G) y la región variable de cadena ligera de (H);

50 Además, la presente invención proporciona anticuerpos anti receptor de IL-6 de cualquiera de los siguientes:

(a) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 159 (región variable de H96-IgG1);

(b) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada en la que al menos uno de los aminoácidos de Trp en la posición 35, Tyr en la posición 51, Ser en la posición 63, Lys en la posición 65, Gly en la posición 66, Val en la posición 99, Ile en la posición 103, Tyr en la posición 108, Glu en la posición 111 y Thr en la posición 113 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 159 (región variable de H96-IgG1) se ha sustituido con otro aminoácido;

(c) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos en la que Lys en la posición 65, Gly en la posición 66, Val en la posición 99, Ile en la posición 103, Glu en la posición 111 y Thr en la posición 113 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 159 (región variable de H96-IgG1) se ha sustituido con otros aminoácidos;

(d) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos en la que Trp en la posición 35, Tyr en la posición 51, Ser en la posición 63, Lys en la posición 65, Gly en la posición 66, Val en la posición 99, Ile en la posición 103 y Tyr en la posición 108 en la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 159 (región variable de H96-IgG1) se han sustituido con otros aminoácidos;

(e) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 160 (región variable de F2H-IgG1);

(f) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 161 (región variable de VH5-M83);

(g) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos en la que Gln en la posición 27 y/o His en la posición 55 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 (PF1L) se han sustituido con otros aminoácidos;

(h) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 162 (región variable de L39);

(i) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 163 (región variable de VL5-Kappa);

(j) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 176 (región variable de VH3-M73);

(k) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 178 (región variable de VH4-M73);

(l) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 177 (región variable de VL3-Kappa);

(m) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 179 (región variable de VL1-Kappa);

(n) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada de (e) y la región variable de cadena ligera de (h);

(o) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada de (f) y la región variable de cadena ligera de (i) (combinación de regiones variables de FV5-M83);

(p) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada de (j) y la región variable de cadena ligera de (l) (combinación de regiones variables de FV4-M73); y

(q) un anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada de (k) y la región variable de cadena ligera de (m) (combinación de regiones variables de FV3-M73);

El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado en la sustitución de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada de (a) a (d) anteriores; sin embargo, se prefieren sustituciones de Trp por Val en la posición 35, Tyr por Phe en la posición 51, Ser por Thr en la posición 63, Lys por Gln en la posición 65, Gly por Asp en la posición 66, Val por Leu en la posición 99, Ile por Ala en la posición 103, Tyr por Val en la posición 108, Glu por Gln en la posición 111, Thr por He en la posición 113. Como alternativa, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado en la sustitución de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de (g) anterior; sin embargo, se prefieren sustituciones de Gln por Glu en la posición 27 e His por Glu en la posición 55. Pueden incluirse sustituciones, supresiones, inserciones y/o adiciones de aminoácidos distintas de la sustitución de aminoácidos descrita anteriormente.

Las regiones constantes de anticuerpo de la presente invención no están particularmente limitadas, y puede usarse cualquier región constante. Por ejemplo, pueden usarse regiones constantes que comprenden una secuencia natural tal como IgG1, IgG2 e IgG4 y regiones constantes modificadas preparadas introduciendo sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en una región constante que comprende una secuencia natural. Los ejemplos de dichas regiones constantes modificadas incluyen las regiones constantes descritas posteriormente.

Los ejemplos de anticuerpos que usan las regiones variables de la presente invención mencionadas anteriormente incluyen:

(1) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 134 (H96-IgG1);

(2) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135 (F2H-IgG1);

(3) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 137 (VH5-IgG1);

(4) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139 (VH5-M83);

(5) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136 (L39);

(6) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 138 (VL5-kappa);

(7) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 180 (VH3-M73);

(8) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 182 (VH4-M73);

(9) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 181 (VL3-kappa);

- (10) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 183 (VL1-kappa);
- (11) un anticuerpo que comprende la cadena pesada de (2) y la cadena ligera de (5);
- (12) un anticuerpo que comprende la cadena pesada de (3) y la cadena ligera de (6);
- 5 (13) un anticuerpo que comprende la cadena pesada de (4) y la cadena ligera de (6) (FV5-M83);
- (14) un anticuerpo que comprende la cadena pesada de (7) y la cadena ligera de (9) (FV4-M73);
- (15) un anticuerpo que comprende la cadena pesada de (8) y la cadena ligera de (10) (FV3-M73); y
- (16) un anticuerpo que tiene una actividad equivalente a la de cualquiera de los anticuerpos de (1) a (15).
- 10 En el presente documento, "que tiene actividad equivalente" significa que la actividad de unión a antígeno y/o actividad neutralizante son equivalentes. La "actividad equivalente" en la presente invención no significa necesariamente actividad completamente idéntica, sino que puede ser, por ejemplo, 50 % o más de la actividad, preferentemente 70 % o más, y más preferentemente 90 % o más.
- 15 Además, la presente invención proporciona CDR y FR de cualquiera de las siguientes:
- (i) una FR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84 (FR1 de cadena pesada de VH5);
- (ii) una FR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 186 (FR1 de
- 20 cadena pesada de VH3 y VH4);
- (iii) una FR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85 (FR2 de cadena pesada de VH3, VH4 y VH5);
- (iv) una FR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 184 (FR3 de
- 25 cadena pesada de VH3, VH4 y VH5);
- (v) una FR4 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 133 (FR4 de cadena pesada de VH3, VH4 y VH5);
- (vi) una FR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92 (FR1 de cadena
- 30 ligera de VL1, VL3 y VL5);
- (vii) una FR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93 (FR2 de cadena ligera de VL1, VL3 y VL5);
- (viii) una FR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97 (FR3 de cadena
- 35 ligera de VL1, VL3 y VL5);
- (ix) una FR4 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98 (FR4 de cadena ligera de VL1, VL3 y VL5);
- (x) Una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 169 (CDR1 de
- 40 cadena pesada de VH3 y VH4);
- (xi) Una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 165 (CDR1 de cadena pesada de VH5);
- (xii) Una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 170 (CDR2 de
- 45 cadena pesada de VH3);
- (xiii) Una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 174 (CDR2 de cadena pesada de VH4);
- (xiv) Una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 166 (CDR2 de
- 50 cadena pesada de VH5);
- (xv) Una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 171 (CDR3 de cadena pesada de VH3 y VH4);
- (xvi) Una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 167 (CDR3 de
- 55 cadena pesada de VH5);
- (xvii) Una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 175 (CDR1 de cadena ligera de VL1);
- (xviii) Una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 172 (CDR1 de
- 60 cadena ligera de VL3);
- (xix) Una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101 (CDR1 de cadena ligera de VL5);
- (xx) Una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173 (CDR2 de
- cadena ligera de VL1 y VL3);
- (xxi) Una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 168 (CDR2 de
- cadena ligera de VL5); y
- (xxii) Una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 (CDR3 de
- cadena ligera de VL1, VL3 y VL5).

Los anticuerpos de la presente divulgación también incluyen fragmentos y productos procesados de anticuerpos que comprenden cualquiera de las sustituciones de aminoácidos descritas anteriormente. Dichos fragmentos de anticuerpo incluyen, por ejemplo, Fab, F(ab')₂, Fv, Fv monocaténario (scFv) en los que se unen entre sí cadenas pesadas y ligeras mediante un enlazador apropiado, cadena pesada de único dominio y cadena ligera de un único dominio (por ejemplo, Nat. Biotechnol. Sep 2005;23(9):1126-36), Unibody (documento WO2007/059782 A1) y SMIP

(documento WO2007/014278 A2). El origen de los anticuerpos no está particularmente limitado. Los anticuerpos incluyen anticuerpos humanos, de ratón, de rata y de conejo. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos quiméricos, humanizados, completamente humanizados o similares.

Específicamente, dichos fragmentos de anticuerpo se obtienen tratando anticuerpos con una enzima, por ejemplo, papaína o pepsina, o construyendo genes para codificar dichos fragmentos de anticuerpo, insertándolos en vectores de expresión y expresándolos después en células hospedadoras apropiadas (véase, por ejemplo, Co, M. S. *et al.*, J. Immunol. (1994) 152:2968-2976; Better, M. and Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178:476-496; Pluckthun, A.; Skerra, A., Methods in Enzymology (1989) 178:497-515; Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121:652-663; Rousseaux, J. *et al.*, Methods in Enzymology (1989) 121:663-66; Bird, R. E. *et al.*, TIBTECH (1991) 9:132-137).

Se obtiene scFv ligando regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos. En dichos scFv, la región variable de cadena pesada se liga a la región variable de cadena ligera mediante un enlazador, preferentemente un enlazador peptídico (Huston, J. S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85:5879-5883). Las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera en un scFv pueden derivar de cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente. El enlazador peptídico para ligar las regiones variables incluye, por ejemplo, péptidos monocatenarios arbitrarios de 12 a 19 restos de aminoácidos.

<Regiones constantes de anticuerpos>

La presente divulgación también proporciona las regiones constantes de anticuerpos de (i) a (xxi) descritas posteriormente que se han mejorado mediante sustitución de aminoácidos. La región constante se refiere a región constante de tipo IgG1, IgG2 o IgG4. La secuencia de aminoácidos de regiones constantes de IgG1, IgG2 e IgG4 humanas son conocidas (región constante IgG humana SEQ ID NO: 19; región constante IgG2 humana, SEQ ID NO: 20; y región constante de IgG4 humana, SEQ ID NO: 21). La secuencia de la región constante de IgG4 humana se ha modificado para mejorar la estabilidad de la región bisagra (Mol. Immunol. Ene 1993;30(1):105-8). La presente divulgación también proporciona anticuerpos que comprenden dicha región constante de anticuerpo que contiene sustituciones de aminoácidos. Las regiones constantes de anticuerpo son preferentemente regiones constantes de anticuerpo humano.

Las regiones constantes de anticuerpo que contienen sustituciones de aminoácidos de la presente divulgación pueden comprender otras sustituciones o modificaciones de aminoácidos siempre que comprendan la sustitución de aminoácidos de una cualquiera de (i) a (xxi) descritas posteriormente. Por lo tanto, las regiones constantes de IgG2 que comprenden las sustituciones de aminoácidos de la presente divulgación en la región constante de IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 incluyen regiones constantes de IgG2 que comprenden una o más sustituciones y/o modificaciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 y comprenden además las sustituciones de aminoácidos de la presente divulgación, así como regiones constantes de IgG2 que comprenden las sustituciones de aminoácidos de la presente divulgación y comprenden además una o más sustituciones y/o modificaciones de aminoácidos. Lo mismo se aplica a regiones constantes de IgG1 que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 y regiones constantes de IgG4 que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

Además, la cadena de azúcar en la posición 297 en el sistema de numeración de EU (véase secuencias de proteínas de interés inmunológico, publicación de NIH N.º 91-3242) puede ser cualquier estructura de cadena de azúcar, o puede no ser ninguna cadena de azúcar ligada en ese sitio (por ejemplo, regiones constantes producidas en células hospedadoras en las que no se produce glucosilación, tales como *E. coli*).

(i) Mejora de la estabilidad de región constante de IgG2 en condiciones ácidas

En una realización, la región constante de IgG2 de la presente divulgación que comprende sustituciones de aminoácidos incluye regiones constantes IgG en la que Met en la posición 276 (posición 397 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 se ha sustituido con otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Val. La estabilidad del anticuerpo en condiciones ácidas puede mejorarse sustituyendo Met en la posición 276 (posición 397 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 con otro aminoácido.

(ii) Mejora de la heterogeneidad de región constante de IgG2

En una realización, la región constante de IgG2 de la presente divulgación que comprende sustituciones de aminoácidos incluye regiones constantes de IgG2 en las que Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración de EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración de EU) y Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 se ha sustituido con otros aminoácidos. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren sustituciones de Cys por Ser en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración de EU), Arg por Lys en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración de EU) y Cys por Ser en la

posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración de EU) (IgG2-SKSC).

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

(iii) Alteración de la unión de región constante de IgG2 con FcγR

En una realización, la presente divulgación también proporciona regiones constantes de IgG2 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que Ala en la posición 209 (EU330), Pro en la posición 210 (EU331) y/o Thr en la posición 218 (EU339) de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 se han sustituido con Ser, Ser y Ala, respectivamente. Ya se ha indicado que las sustituciones de Ala en la posición 209 (EU330) y de Pro en la posición 210 (EU331) permiten la alteración de la unión de Fcγ (Eur. J. Immunol. Ago 1999;29(8):2613-24). Desde la perspectiva de riesgo de inmunogenicidad, sin embargo, estas modificaciones no se prefieren debido a que dan como resultado generación de péptidos derivados no humanos que pueden convertirse en epítopos de linfocitos T. Sin embargo, la unión al receptor de Fcγ de IgG2 puede reducirse sustituyendo Thr por Ala en la posición 218 (EU339) al mismo tiempo, y los péptidos de 9-12 aminoácidos que pueden convertirse en epítopos de linfocitos T derivan solamente de ser humano.

Las regiones constantes de IgG2 usada en la presente divulgación que comprenden sustituciones de aminoácidos comprenden al menos uno de los tres tipos de sustituciones de aminoácidos descritos anteriormente; sin embargo, las regiones constantes de IgG2 preferentemente comprenden los tres tipos de las sustituciones de aminoácidos descritos anteriormente. En una realización preferida, las regiones constantes de IgG2 de la presente divulgación que comprenden sustituciones de aminoácidos incluyen regiones constantes de IgG que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que Ala en la posición 209 (EU330), Pro en la posición 210 (EU331) y Thr en la posición 218 (EU339) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 se han sustituido con Ser, Ser y Ala, respectivamente.

(iv) Mejora de la heterogeneidad C terminal de región constante de IgG2

La presente divulgación proporciona regiones constantes de IgG2 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración de EU) y Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración de EU) se han suprimido la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. La heterogeneidad originada a partir del extremo C terminal de cadena pesada de anticuerpo puede reducirse solamente cuando ambos aminoácidos se suprimen.

(v) Mejora de la conservación en plasma modificando la región constante IgG2

Una realización de las regiones constantes de IgG2 con sustituciones de aminoácidos de la presente divulgación incluye regiones constantes de IgG2 en las que His en la posición 147 (posición 268 en el sistema de numeración de EU), Arg en la posición 234 (posición 355 en el sistema de numeración de EU) y Gln en la posición 298 (posición 419 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 se han sustituido con otros aminoácidos. Estas sustituciones de aminoácidos permiten mejorar la conservación en plasma del anticuerpo. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren sustituciones de His por Gln en la posición 147 (posición 268 en el sistema de numeración de EU), Arg por Gln en la posición 234 (posición 355 en el sistema de numeración de EU) y Gln por Glu en la posición 298 (posición 419 en el sistema de numeración de EU). Las regiones constantes de IgG2 con sustituciones de aminoácidos de la presente divulgación incluyen regiones constantes de IgG2 que comprenden al menos uno de los tres tipos de las sustituciones de aminoácidos descritas anteriormente; sin embargo, las regiones constantes de IgG2 preferentemente comprenden los tres tipos de sustituciones de aminoácidos descritos anteriormente.

(vi) Mejora de la estabilidad de región constante de IgG4 en condiciones ácidas

La presente divulgación proporciona regiones constantes de IgG4 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que Arg en la posición 289 (posición 409 en el sistema de numeración de EU) de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 se ha sustituido con otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Lys. La estabilidad del anticuerpo en condiciones ácidas puede mejorarse sustituyendo Arg en la posición 289 (posición 409 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 con otro aminoácido.

(vii) Mejora de la heterogeneidad C terminal de la región constante de IgG4

La presente divulgación proporciona regiones constantes de IgG4 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que Gly en la posición 326 (posición 446 en el sistema de numeración de EU) y Lys en la posición 327

(posición 447 en el sistema de numeración de EU) se han suprimido en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21. La heterogeneidad originada del extremo C terminal de cadena pesada de anticuerpo puede reducirse solamente cuando se suprimen ambos aminoácidos.

5 (viii) Mejora de la heterogeneidad C terminal de la región constante de IgG1

La presente divulgación proporciona regiones constantes de IgG1 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que Gly en la posición 329 (posición 446 en el sistema de numeración de EU) y Lys en la posición 330 (posición 447 en el sistema de numeración de EU) se han suprimido en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. La heterogeneidad originada del extremo C terminal de cadena pesada de anticuerpo puede reducirse solamente cuando se suprimen ambos aminoácidos.

(ix)

15 La presente divulgación proporciona regiones constantes de IgG1 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que Asn en la posición 317 (posición 434 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 se ha sustituido con otro aminoácido.

20 El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Ala.

(x)

25 La presente divulgación proporciona regiones constantes de IgG2 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que Ala en la posición 209 (posición 330 en el sistema de numeración de EU), Pro en la posición 210 (posición 331 en el sistema de numeración de EU), Thr en la posición 218 (posición 339 en el sistema de numeración de EU), Met en la posición 276 (posición 397 en el sistema de numeración de EU), Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración de EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración de EU), Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración de EU), Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración de EU) y Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 se han sustituido con otros aminoácidos.

30 El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren sustituciones de Ala por Ser en la posición 209 Pro por Ser en la posición 210, Thr por Ala en la posición 218, Met por Val en la posición 276, Cys por Ser en la posición 14, Arg por Lys en la posición 16, Cys por Ser en la posición 102, Glu por Gly en la posición 20 y Ser por Gly en la posición 21.

(xi)

40 La presente divulgación proporciona regiones constantes de IgG2 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que Ala en la posición 209 (posición 330 en el sistema de numeración de EU), Pro en la posición 210 (posición 331 en el sistema de numeración de EU), Thr en la posición 218 (posición 339 en el sistema de numeración de EU), Met en la posición 276 (posición 397 en el sistema de numeración de EU), Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración de EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración de EU), Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración de EU), Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración de EU) y Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración de EU) se han sustituido con otros aminoácidos y simultáneamente Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración de EU) y Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración de EU) se han suprimido en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

50 El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren sustituciones de Ala por Ser en la posición 209 Pro por Ser en la posición 210, Thr por Ala en la posición 218, Met por Val en la posición 276, Cys por Ser en la posición 14, Arg por Lys en la posición 16, Cys por Ser en la posición 102, Glu por Gly en la posición 20 y Ser por Gly en la posición 21.

(xii)

60 La presente divulgación proporciona regiones constantes de IgG2 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que Met en la posición 276 (posición 397 en el sistema de numeración de EU), Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración de EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración de EU), Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración de EU), Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración de EU) y Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 se han sustituido con otros aminoácidos.

65 El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren sustituciones de Met por Val en la posición 276, Cys por Ser en la posición 14, Arg por Lys en la posición 16, Cys

por Ser en la posición 102, Glu por Gly en la posición 20 y Ser por Gly en la posición 21.

(xiii)

- 5 La presente divulgación proporciona regiones constantes de IgG2 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que Met en la posición 276 (posición 397 en el sistema de numeración de EU), Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración de EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración de EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración de EU), Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración de EU), Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración de EU) y Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración de EU) se han sustituido con otros aminoácidos y simultáneamente Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración de EU) y Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración de EU) se han suprimido en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
- 10
- 15 El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren sustituciones de Met por Val en la posición 276, Cys por Ser en la posición 14, Arg por Lys en la posición 16, Cys por Ser en la posición 102, Glu por Gly en la posición 20 y Ser por Gly en la posición 21.

(xiv)

- 20 La presente divulgación proporciona regiones constantes de IgG2 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración de EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración de EU), Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración de EU), Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración de EU), Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración de EU), His en la posición 147 (posición 268 en el sistema de numeración de EU), Arg en la posición 234 (posición 355 en el sistema de numeración de EU) y Gln en la posición 298 (posición 419 en el sistema de numeración de EU) se han sustituido con otros aminoácidos y simultáneamente Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración de EU) y Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración de EU) se han suprimido en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
- 25
- 30 El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren sustituciones de Cys por Ser en la posición 14, Arg por Lys en la posición 16, Cys por Ser en la posición 102, Glu por Gly en la posición 20, Ser por Gly en la posición 21, His por Gln en la posición 147, Arg por Gln en la posición 234 y Gln por Glu en la posición 298.
- 35

(xv)

- 40 La presente divulgación proporciona regiones constantes de IgG2 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración de EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración de EU), Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración de EU), Glu en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración de EU), Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración de EU), His en la posición 147 (posición 268 en el sistema de numeración de EU), Arg en la posición 234 (posición 355 en el sistema de numeración de EU), Gln en la posición 298 (posición 419 en el sistema de numeración de EU) y Asn en la posición 313 (posición 434 en el sistema de numeración de EU) se han sustituido con otros aminoácidos y simultáneamente Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración de EU) y Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración de EU) se han suprimido en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
- 45
- 50 El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren sustituciones de Cys por Ser en la posición 14, Arg por Lys en la posición 16, Cys por Ser en la posición 102, Glu por Gly en la posición 20, Ser por Gly en la posición 21, His por Gln en la posición 147, Arg por Gln en la posición 234, Gln por Glu en la posición 298 y Asn por Ala en la posición 313.

(xvi)

- 55 La presente divulgación proporciona regiones constantes de IgG4 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que Arg en la posición 289 (posición 409 en el sistema de numeración de EU), Cys en la posición 14, Arg en la posición 16, Glu en la posición 20, Ser en la posición 21, Arg en la posición 97, Ser en la posición 100, Tyr en la posición 102, Gly en la posición 103, Pro en la posición 104 y Pro en la posición 105 (posición 131, 133, 137, 138, 214, 217, 219, 220, 221 y 222 en el sistema de numeración de EU, respectivamente), Glu en la posición 113, Phe en la posición 114 y Leu en la posición 115 (posición 233, 234 y 235 en el sistema de numeración de EU, respectivamente) se han sustituido con otros aminoácidos y simultáneamente Gly en la posición 116 (posición 236 en el sistema de numeración de EU) se han suprimido en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.
- 60
- 65 El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren sustituciones de Cys por Ser en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración de EU), Arg por Lys en la

posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración de EU), Glu por Gly en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración de EU), Ser por Gly en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración de EU), Arg por Thr en la posición 97 (posición 214 en el sistema de numeración de EU), Ser por Arg en la posición 100 (posición 217 en el sistema de numeración de EU), Tyr por Ser en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración de EU), Gly por Cys en la posición 103 (posición 220 en el sistema de numeración de EU), Pro por Val en la posición 104 (posición 221 en el sistema de numeración de EU), Pro por Glu en la posición 105 (posición 222 en el sistema de numeración de EU), Glu por Pro en la posición 113 (posición 233 en el sistema de numeración de EU), Phe por Val en la posición 114 (posición 234 en el sistema de numeración de EU), Leu por Ala en la posición 115 (posición 235 en el sistema de numeración de EU) y Arg por Lys en la posición 289 (posición 409 en el sistema de numeración de EU).

(xvii)

La presente divulgación proporciona regiones constantes de IgG4 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que Arg en la posición 289 (posición 409 en el sistema de numeración de EU), Cys en la posición 14, Arg en la posición 16, Glu en la posición 20, Ser en la posición 21, Arg en la posición 97, Ser en la posición 100, Tyr en la posición 102, Gly en la posición 103, Pro en la posición 104 y Pro en la posición 105 (posiciones 131, 133, 137, 138, 214, 217, 219, 220, 221 y 222 en el sistema de numeración de EU, respectivamente), Glu en la posición 113, Phe en la posición 114 y Leu en la posición 115 (posición 233, 234 y 235 en el sistema de numeración de EU, respectivamente) se han sustituido con otros aminoácidos y simultáneamente, Gly en la posición 326 (posición 446 en el sistema de numeración de EU) y Lys en la posición 327 (posición 447 en el sistema de numeración de EU) se han suprimido en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

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

(xviii)

La presente divulgación proporciona regiones constantes de IgG4 que comprenden una secuencia de aminoácidos en la que Asn en la posición 317 (posición 434 en el sistema de numeración de EU) se ha sustituido con otro aminoácido, y simultáneamente Gly en la posición 329 (posición 446 en el sistema de numeración de EU) y Lys en la posición 330 (posición 447 en el sistema de numeración de EU) se han suprimido en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

El tipo de aminoácido después de la sustitución de Asn en la posición 317 (posición 434 en el sistema de numeración de EU) no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Ala.

(xix)

A continuación, hay una realización preferida de IgG2 de la presente divulgación, que tiene heterogeneidad reducida en la región bisagra y/o actividad de unión a receptor de Fcγ reducida.

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

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

Dichas regiones constantes de IgG2 incluyen, por ejemplo, regiones constantes de IgG2 que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 191 (M86).

En otra realización preferida, las regiones constantes de IgG2 de la presente divulgación incluyen regiones constantes de IgG2 resultantes de la supresión de Gly en la posición 325 y Lys en la posición 326 en las regiones constantes de IgG2 anteriormente descritas para reducir la heterogeneidad C terminal. Dichos anticuerpos incluyen, por ejemplo, IgG2 que comprende una región constante que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 192 (M86ΔGK).

(xx)

A continuación, hay otra realización preferida de las regiones constantes de IgG2 de la presente divulgación, que tienen heterogeneidad reducida en la región bisagra.

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

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

Dichas regiones constantes de IgG2 incluyen, por ejemplo, regiones constantes de IgG2 que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 193 (M40).

En otra realización preferida, las regiones constantes de IgG2 de la presente divulgación incluyen regiones constantes de IgG2 que comprenden además la supresión de Gly en la posición 325 y Lys en la posición 326 en las regiones constantes de IgG2 descritas anteriormente. Dichos anticuerpos incluyen, por ejemplo, regiones constantes de IgG2 que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 194 (M40ΔGK).

(xxi) M14ΔGK, M17ΔGK, M11ΔGK, M31ΔGK, M58, M73, M86ΔGK y M40ΔGK

La presente divulgación también proporciona una región constante de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 24 (M14ΔGK). La presente divulgación también proporciona una región constante de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116 (M17ΔGK). La presente divulgación también proporciona una región constante de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (M11ΔGK). La presente divulgación proporciona además una región constante de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118 (M31ΔGK). La presente divulgación proporciona además una región constante de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 151 (M58). La presente divulgación proporciona además una región constante de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 153 (M73). La presente divulgación proporciona además una región constante de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 164 (M83). La presente divulgación proporciona además una región constante de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 192 (M86ΔGK). La presente divulgación proporciona además una región constante de anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 194 (M40ΔGK). Estas regiones constantes de anticuerpo se han optimizado para tener actividad de unión al receptor de Fcγ reducida, riesgo de inmunogenicidad reducido, estabilidad mejorada en condiciones ácidas, heterogeneidad reducida, conservación en plasma mejorada y/o mayor estabilidad en preparaciones en comparación con la región constante de IgG1.

La presente divulgación proporciona anticuerpos que comprenden la región constante de anticuerpo de uno cualquiera de (i) a (xxi) descritos anteriormente. No existe limitación sobre el tipo de antígeno y origen de anticuerpo, siempre que los anticuerpos comprendan una región constante de anticuerpo descrita anteriormente. Los anticuerpos preferidos incluyen, por ejemplo, anticuerpos que se unen con receptor de IL-6. Como alternativa, los anticuerpos preferidos incluyen, por ejemplo, anticuerpos humanizados. Dichos anticuerpos incluyen, por ejemplo, anticuerpos que comprenden la región variable de anticuerpo PM-1 humanizado. Dicha región variable de anticuerpo PM-1 humanizado puede comprender cualquiera de las sustituciones de aminoácidos anteriormente descritas, u otras sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos. Específicamente, las sustituciones incluyen, por ejemplo, modificaciones que mejoran la afinidad de (a) a (y) descritas anteriormente; modificaciones que reducen el punto isoelectrico de (i) a (viii) descrito anteriormente; modificaciones que mejoran la estabilidad de (α) a (ζ) descritas anteriormente; y modificaciones que reducen la inmunogenicidad, pero no se limitan a las mismas.

En una realización, dichos anticuerpos incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113 (PF_1 + M14ΔGK) y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 (PF1_L) (la región constante de

cadena ligera puede ser kappa o lambda, o una forma modificada de la misma) (PF1), pero sin limitación a las mismas.

5 Como alternativa, las regiones constantes de anticuerpo descritas anteriormente y/o moléculas de anticuerpo que comprenden una región constante de anticuerpo descrita anteriormente pueden unirse como una forma de molécula de fusión de Fc con molécula de unión de tipo anticuerpo (moléculas de armazón), péptidos bioactivos, péptidos de unión o similares.

10 Los anticuerpos de la presente divulgación también pueden obtenerse mediante, por ejemplo, los siguientes métodos además de los descritos en los Ejemplos. En una realización para obtener anticuerpos de la presente divulgación, se sustituyen en primer lugar uno o más restos de aminoácidos con aminoácidos de interés en al menos una región seleccionada del grupo que consiste en CDR, FR y regiones constantes de un anticuerpo anti receptor de IL-6 conocido por los expertos en la materia. Los métodos para obtener anticuerpos anti receptor de IL-6 conocidos por los expertos en la materia no están limitados. Los métodos para sustituir uno o más restos de aminoácidos con aminoácidos de interés en al menos una región seleccionada del grupo que consiste en las CDR, FR y regiones constantes incluyen, por ejemplo, mutagénesis dirigida (Hashimoto-Gotoh, T., Mizuno, T., Ogasahara, Y., y Nakagawa, M. An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. *Gene* (1995) 152: 271-275; Zoller, M. J., y Smith, M. Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Methods Enzymol.* (1983) 100: 468-500; Kramer, W., Drutsa, V., Jansen, H. W., Kramer, B., Pflugfelder, M., y Fritz, H. J. The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. *Nucleic Acids Res.* (1984) 12: 9441-9456; Kramer W., y Fritz H. J. Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA Methods. *Enzymol.* (1987) 154: 350-367; Kunkel, T. A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82: 488-492). Estos métodos pueden usarse para sustituir aminoácidos diana en anticuerpos con aminoácidos de interés. Los métodos para sustituir aminoácidos incluyen tecnologías de biblioteca tales como redistribución de marco conservado (*Mol Immunol.* abr 2007; 44 (11): 3049-60) y reparación de CDR (documento US2006/0122377). Usando estos métodos, los aminoácidos pueden sustituirse en marcos conservados y CDR apropiados.

30 En otra realización para obtener anticuerpos, se prepara en primer lugar un anticuerpo que se une con receptor de IL-6 por métodos conocidos por los expertos en la materia. Cuando el anticuerpo preparado deriva de un animal no humano, se puede humanizar. Entonces, el anticuerpo preparado se ensaya para evaluar si tiene actividad neutralizante usando métodos conocidos por los expertos en la materia. La actividad de unión y actividad neutralizante de anticuerpos puede determinarse, por ejemplo, mediante los métodos descritos en los Ejemplos; sin embargo, dichos métodos no se limitan a los mismos. A continuación, uno o más restos de aminoácidos en al menos uno seleccionado del grupo que consiste en CDR, FR y regiones constantes de anticuerpo, se sustituyen con aminoácidos de interés.

40 Más específicamente, la presente invención se refiere a métodos para producir anticuerpos con actividad neutralizante, actividad de unión o estabilidad mejoradas, o inmunogenicidad reducida, que comprenden las etapas de:

- (a) expresar un ADN que codifica una cadena pesada en el que uno o más restos de aminoácidos en al menos una región seleccionada del grupo que consiste en CDR, FR y regiones constantes se sustituyen con aminoácidos de interés, y un ADN que codifica una cadena ligera en el que uno o más restos de aminoácidos en al menos una región seleccionada del grupo que consiste en regiones CDR y FR se sustituyen con aminoácidos de interés; y
- (b) recoger los productos de expresión de la etapa (a).

50 La primera etapa de los métodos de producción de la presente divulgación es expresar un ADN que codifica una cadena pesada de anticuerpo anti receptor de IL-6 mutante en la que uno o más restos de aminoácidos en al menos una región seleccionada del grupo que consiste en CDR, FR y regiones constantes se sustituyen con aminoácidos de interés, y un ADN que codifica una cadena ligera de anticuerpo anti receptor de IL-6 en la que uno o más restos de aminoácidos en al menos una región seleccionada del grupo que consiste en regiones CDR y FR se sustituyen con aminoácidos de interés. Un ADN que codifica una cadena pesada en la que uno o más restos de aminoácidos en al menos una región seleccionada del grupo que consiste en CDR, FR y regiones constantes se sustituyen con aminoácidos de interés puede prepararse, por ejemplo, obteniendo un ADN que codifica la región CDR, FR o constante de una cadena pesada de tipo silvestre e introduciendo una sustitución apropiada de modo que un codón que codifica un aminoácido particular en al menos uno seleccionado del grupo que consiste en las regiones CDR, FR y constantes codifica un aminoácido de interés. Además, puede prepararse un ADN que codifica una cadena ligera en la que uno o más restos de aminoácidos en al menos uno seleccionado del grupo que consiste en regiones CDR y FR se sustituyen con aminoácidos de interés, por ejemplo, obteniendo un ADN que codifica las regiones CDR y/o FR de una cadena ligera de tipo silvestre e introduciendo una sustitución apropiada de modo que un codón que codifica un aminoácido particular en las regiones CDR y/o FR codifica un aminoácido de interés.

65 Como alternativa, un ADN que codifica una cadena pesada en la que uno o más restos de aminoácidos en al menos uno seleccionado del grupo que consiste en regiones CDR, FR y constantes se sustituyen con aminoácidos de

interés también puede prepararse diseñando y después sintetizando químicamente un ADN que codifica una proteína en la que uno o más restos de aminoácidos en al menos uno seleccionado del grupo que consiste en regiones CDR, FR y constantes de la cadena pesada de tipo silvestre se sustituyen con aminoácidos de interés. Además, un ADN que codifica una cadena ligera en la que uno o más restos de aminoácidos en las regiones CDR y/o FR se sustituyen con aminoácidos de interés también pueden prepararse diseñando y después sintetizando químicamente un ADN que codifica una proteína en la que uno o más restos de aminoácidos en las regiones CDR y/o FR de una cadena ligera de tipo silvestre se sustituyen con aminoácidos de interés.

El tipo de sustitución de aminoácidos incluye las sustituciones descritas en el presente documento, pero no se limita a las mismas.

Como alternativa, un ADN que codifica una cadena pesada en la que uno o más restos de aminoácidos en al menos una región seleccionada del grupo que consiste en las regiones CDR, FR y constantes se sustituyen con aminoácidos de interés también puede prepararse como una combinación de ADN parciales. Dichas combinaciones de ADN parciales incluyen, por ejemplo, la combinación de un ADN que codifica una región variable y un ADN que codifica una región constante, y la combinación de un ADN que codifica una región Fab y un ADN que codifica un dominio Fc, pero no se limita a los mismos. También puede prepararse un ADN que codifica una cadena ligera como una combinación de ADN parciales.

Los métodos para expresar los ADN anteriormente descritos incluyen los métodos descritos posteriormente. Por ejemplo, se construye un vector de expresión de cadena pesada insertando un ADN que codifica una región variable de cadena pesada en un vector de expresión junto con un ADN que codifica una región constante de cadena pesada. De forma similar, se construye un vector de expresión de cadena ligera insertando un ADN que codifica una región variable de cadena ligera en un vector de expresión junto con un ADN que codifica una región constante de cadena ligera. Como alternativa, estos genes de cadena pesada y ligera pueden insertarse en un único vector. Los vectores de expresión incluyen, por ejemplo, vectores basados en virus SV40, vectores basados en virus EB y vectores basados en virus BPV (virus del papiloma), pero no se limitan a los mismos.

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

En la siguiente etapa de producción de anticuerpos, se recogen los productos de expresión obtenidos en la etapa (a). Los productos de expresión pueden recogerse, por ejemplo, cultivando los transformantes y separando después los productos de las células transformadas o el medio de cultivo. Puede conseguirse separación y purificación de anticuerpos mediante una combinación apropiada de métodos tales como centrifugación, fraccionamiento con sulfato de amonio, precipitación por adición de sales, ultrafiltración, columnas de 1q, FcRn, proteína A y proteína G, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de filtración en gel.

Los expertos en la materia pueden preparar de forma apropiada las regiones constantes de la presente invención de acuerdo con los métodos para preparar anticuerpos.

La presente divulgación se refiere además a métodos para potenciar la actividad de un anticuerpo anti receptor de IL-6 para unirse con o neutralizar un receptor de IL-6, que comprenden al menos una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

- (A) sustituir Ser en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (HCDR1) con otro aminoácido;
- (B) sustituir Trp en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (HCDR1) con otro aminoácido;
- (C) sustituir Tyr en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (HCDR2) con otro aminoácido;
- (D) sustituir Thr en la posición 8 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (HCDR2) con otro aminoácido;
- (E) sustituir Thr en la posición 9 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (HCDR2) con otro aminoácido;
- (F) sustituir Ser en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (HCDR3) con otro aminoácido;
- (G) sustituir Leu en la posición 2 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (HCDR3) con otro

- aminoácido;
 (H) sustituir Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (HCDR3) con otro aminoácido;
 (I) sustituir Ala en la posición 7 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (HCDR3) con otro aminoácido;
 5 (J) sustituir Met en la posición 8 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (HCDR3) con otro aminoácido;
 (K) sustituir Ser en la posición 1 y Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (HCDR3) con otros aminoácidos;
 (L) sustituir Leu en la posición 2, Ala en la posición 7 y Met en la posición 8 en la secuencia de aminoácidos de
 10 SEQ ID NO: 3 (HCDR3) con otros aminoácidos;
 (M) sustituir Arg en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (LCDR1) con otro aminoácido;
 (N) sustituir Gln en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (LCDR1) con otro aminoácido;
 15 (O) sustituir Tyr en la posición 9 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (LCDR1) con otro aminoácido;
 (P) sustituir Asn en la posición 11 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (LCDR1) con otro aminoácido;
 (Q) sustituir Thr en la posición 2 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (LCDR2) con otro aminoácido;
 20 (R) sustituir Gln en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (LCDR3) con otro aminoácido;
 (S) sustituir Gly en la posición 3 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (LCDR3) con otro aminoácido;
 (T) sustituir Tyr en la posición 9 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (LCDR1) y Gly en la posición
 25 3 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (LCDR3) con otros aminoácidos;
 (U) sustituir Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (LCDR3) con otro aminoácido;
 (V) sustituir Gln en la posición 1 y Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (LCDR3) con otros aminoácidos; y
 (W) sustituir Thr en la posición 9 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (HCDR2) y Ser en la posición
 1 y Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (HCDR3) con otros aminoácidos; o
 30 (X) una etapa que comprende (V) y (W).

En (A) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefiere sustitución a Trp, Thr, Asp, Asn, Arg, Val, Phe, Ala, Gln, Tyr, Leu, His, Glu o Cys.

En (B) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefiere sustitución a He o Val.

En (C) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefiere sustitución a Phe.

En (D) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefiere sustitución a Arg.

En (E) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefiere sustitución a Ser o Asn.

En (F) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefiere sustitución a Ile, Val, Thr o Leu.

En (G) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefiere sustitución a Thr.

En (H) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefiere sustitución a Ala, Ile o Ser. Otras sustituciones preferidas incluyen sustitución de Thr por Ser en la posición 5.

En (I) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefiere sustitución a Ser o Val.

En (J) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefiere sustitución a Leu.

En (K) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefieren sustituciones de Ser por Leu en la posición 1 y Thr por Ala en la posición 5. Otras sustituciones preferidas incluyen las de Ser por Val en la posición 1 y Thr por Ala en la

posición 5; Ser por Ile en la posición 1 y Thr por Ala en la posición 5; Ser por Thr en la posición 1 y Thr por Ala en la posición 5; Ser por Val en la posición 1 y Thr por He en la posición 5; Ser por Ile en la posición 1 y Thr por Ile en la posición 5; Ser por Thr en la posición 1 y Thr por He en la posición 5; y Ser por Leu en la posición 1 y Thr por He en la posición 5.

5 En (L) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefiere sustitución de Leu por Thr en la posición 2, Ala por Val en la posición 7 y Met por Leu en la posición 8.

10 En (M) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefiere sustitución a Phe.

En (N) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefiere sustitución a Arg o Thr.

15 En (O) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefiere sustitución a Phe.

20 En (P) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefiere sustitución a Ser.

En (Q) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefiere sustitución a Gly.

25 En (R) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefiere sustitución a Gly, Asn o Ser.

En (S) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefiere sustitución a Ser.

30 En (T) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefieren sustituciones de Tyr por Phe en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (LCDR1) y Gly por Ser en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (LCDR3).

35 En (U) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefiere sustitución a Arg o Ser.

40 En (V) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la afinidad; sin embargo, se prefieren sustituciones de Gln por Gly en la posición 1 y Thr por Ser en la posición 5. Otras sustituciones preferidas incluyen las de Gln por Gly en la posición 1 y Thr por Arg en la posición 5.

45 En (W) descrito anteriormente, se prefiere la sustitución de Thr por Asn en la posición 9 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (HCDR2). Las combinaciones preferidas de aminoácidos después de la sustitución de Ser en la posición 1 y Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (HCDR3) incluyen Leu y Ala, Val y Ala, Ile y Ala, Thr y Ala, Val e Ile, Ile e Ile, Thr e Ile y Leu e Ile.

50 En las etapas de (A) a (X) anteriores, el método para la sustitución de aminoácidos no está particularmente limitado. La sustitución puede conseguirse, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida descrita anteriormente o un método descrito en los Ejemplos. Cuando un aminoácido se sustituye en una región variable de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos original de la región variable de cadena pesada antes de la sustitución es preferentemente una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de un anticuerpo PM-1 humanizado. Como alternativa, cuando se sustituye un aminoácido en una región variable de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos original de la región variable de cadena ligera antes de la sustitución es preferentemente una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un anticuerpo PM-1 humanizado. Además, es preferible introducir las sustituciones de aminoácidos de las etapas (A) a (X) descritas anteriormente en el anticuerpo PM-1 humanizado.

60 Los métodos de la presente divulgación para potenciar la actividad de unión o neutralización de un anticuerpo anti receptor de IL-6 comprenden al menos una cualquiera de las etapas de (A) a (X) descritas anteriormente. Específicamente, los métodos de la presente invención pueden comprender dos o más de las etapas de (A) a (X) descritas anteriormente. Además, los métodos de la presente invención pueden comprender otras etapas (por ejemplo, sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos distintas de las de (A) a (X) descritas anteriormente) siempre que comprendan una cualquiera de las etapas de (A) a (X) descritas anteriormente. Además, por ejemplo, FR puede comprender sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos y la región constante puede comprender sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos. Es preferible

introducir las sustituciones de aminoácidos descritas anteriormente en el anticuerpo PM-1 humanizado.

<Métodos para reducir el riesgo de inmunogenicidad de un anticuerpo anti receptor de IL-6>

La presente divulgación también se refiere a métodos para reducir la inmunogenicidad de un anticuerpo anti receptor de IL-6, que comprenden la etapa de sustituir Thr por Gly en la posición 2 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (LCDR2). Los métodos de la presente invención para reducir la inmunogenicidad de un anticuerpo anti receptor de IL-6 puede comprender otras etapas de sustitución de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa de sustituir Thr por Gly en la posición 2 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (LCDR2). El método para sustitución de aminoácidos no está particularmente limitado. La sustitución puede conseguirse, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida descrita anteriormente o un método descrito en los Ejemplos.

Es preferible introducir las sustituciones de aminoácidos descritas anteriormente en el anticuerpo PM-1 humanizado o una variante del mismo que comprende sustituciones, supresiones y/o inserciones.

<Métodos para reducir el punto isoeléctrico de un anticuerpo anti receptor de IL-6>

La presente divulgación también se refiere a métodos para reducir el punto isoeléctrico de un anticuerpo anti receptor de IL-6, que comprende al menos una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) sustituir Gln en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (HFR1) con otro aminoácido;
- (ii) sustituir Arg en la posición 8 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 (HFR2) con otro aminoácido;
- (iii) sustituir Arg en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 (HFR3) con otro aminoácido;
- (iv) sustituir Gln en la posición 3 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 (HFR4) con otro aminoácido;
- (v) sustituir Arg en la posición 18 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 (LFR1) con otro aminoácido;
- (vi) sustituir Lys en la posición 11 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 (LFR2) con otro aminoácido;
- (vii) sustituir Gln en la posición 23 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (LFR3) con otro aminoácido;
- (viii) sustituir Lys en la posición 10 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 (LFR4) con otro aminoácido;
- (ix) sustituir Ser en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (HCDR1) con otro aminoácido;
- (x) sustituir Arg en la posición 1 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (LCDR1) con otro aminoácido;
- (xi) sustituir Arg en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (LCDR2) con otro aminoácido;
- (xii) sustituir Arg en la posición 13 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (HFR1) con otro aminoácido;
- (xiii) sustituir Lys en la posición 15 y/o Ser en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (HFR1) o 100 con otros aminoácidos;
- (xiv) sustituir Gln en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (LCDR1) o 101 con otro aminoácido; y
- (xv) sustituir His en la posición 6 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (LCDR2) o 103 con otro aminoácido.

En (i) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se reduzca el punto isoeléctrico; sin embargo, se prefiere sustitución a Glu.

En (ii) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se reduzca el punto isoeléctrico; sin embargo, se prefiere sustitución a Glu.

En (iii) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se reduzca el punto isoeléctrico; sin embargo, se prefiere sustitución a Lys.

En (iv) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se reduzca el punto isoeléctrico; sin embargo, se prefiere sustitución a Glu.

En (v) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se reduzca el punto isoeléctrico; sin embargo, se prefiere sustitución a Ser.

En (vi) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se reduzca el punto isoeléctrico; sin embargo, se prefiere sustitución a Glu.

En (vii) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se reduzca el punto isoeléctrico; sin embargo, se prefiere sustitución a Glu.

En (viii) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se reduzca el punto isoeléctrico; sin embargo, se prefiere sustitución a Glu.

5 En (ix) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se reduzca el punto isoeléctrico; sin embargo, se prefiere sustitución a Asp.

En (x) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se reduzca el punto isoeléctrico; sin embargo, se prefiere sustitución a Gln.

10 En (xi) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se reduzca el punto isoeléctrico; sin embargo, se prefiere sustitución a Glu.

En (xii) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se reduzca el punto isoeléctrico; sin embargo, se prefiere sustitución a Lys.

15 En (xiii) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se reduzca el punto isoeléctrico; sin embargo, se prefieren sustituciones Lys por Gln en la posición 15 y Ser por Asp en la posición 16.

20 En (xiv) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se reduzca el punto isoeléctrico; sin embargo, se prefiere sustitución a Glu.

En (xv) descrito anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se reduzca el punto isoeléctrico; sin embargo, se prefiere sustitución a Glu.

25 En las etapas de (i) a (xv) descritas anteriormente, el método para la sustitución de aminoácidos no está particularmente limitado. La sustitución puede conseguirse, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida descrita anteriormente o un método descrito en los Ejemplos. Cuando un aminoácido se sustituye en una región variable de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos original de la región variable de cadena pesada antes de la sustitución es preferentemente una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de un anticuerpo PM-1 humanizado. Como alternativa, cuando se sustituye un aminoácido en una región variable de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos original de la región variable de cadena ligera antes de la sustitución es preferentemente una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un anticuerpo PM-1 humanizado. Además, es preferible introducir las sustituciones de aminoácidos de las etapas (i) a (xv) descritas anteriormente en el anticuerpo PM-1 humanizado.

Los métodos de la presente divulgación para reducir el punto isoeléctrico de un anticuerpo anti receptor de IL-6 comprenden al menos una cualquiera de las etapas de (i) a (xv) descritas anteriormente. Específicamente, los métodos de la presente invención pueden comprender dos o más de las etapas de (i) a (xv) descritas anteriormente. Además, los métodos de la presente invención pueden comprender otras etapas (por ejemplo, sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos distintas de las de (i) a (xv) descritas anteriormente) siempre que comprendan una cualquiera de las etapas de (i) a (xv) descritas anteriormente. Además, por ejemplo, la región constante puede comprender sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos.

45 <Métodos para mejorar la estabilidad de un anticuerpo anti receptor de IL-6>

La presente divulgación también se refiere a métodos para aumentar la estabilidad de un anticuerpo anti receptor de IL-6, que comprenden al menos una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

- 50 (α) sustituir Met en la posición 4 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 (HFR3) con otro aminoácido;
 (β) sustituir Leu en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 (HFR3) con otro aminoácido;
 (γ) sustituir Thr en la posición 9 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (HCDR2) con otro aminoácido;
 (δ) sustituir Thr en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (LCDR3) con otro aminoácido;
 55 (ε) sustituir Ser en la posición 16 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (HCDR2) con otro aminoácido; y
 (ζ) sustituir Ser en la posición 5 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 (FR4) con otro aminoácido.

En (α) descrita anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la estabilidad; sin embargo, se prefiere la sustitución a Ile.

60 En (β) descrita anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la estabilidad; sin embargo, se prefiere la sustitución a Ser.

En (γ) descrita anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la estabilidad; sin embargo, se prefiere la sustitución a Asn.

65

En (δ) descrita anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la estabilidad; sin embargo, se prefiere la sustitución a Ser.

5 En (ε) descrita anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la estabilidad; sin embargo, se prefiere la sustitución a Gly.

En (ζ) descrita anteriormente, el tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado siempre que se mejore la estabilidad; sin embargo, se prefiere la sustitución a Ile.

10 En las etapas de (α) a (ζ) descritas anteriormente, el método para sustitución de aminoácidos no está particularmente limitado. La sustitución puede conseguirse, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida descrita anteriormente o un método descrito en los Ejemplos. Cuando se sustituye un aminoácido en una región variable de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos original de la región variable de cadena pesada antes de la sustitución es preferentemente una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de un anticuerpo PM-1 humanizado. Como alternativa, cuando se sustituye un aminoácido en una región variable de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos original de la región variable de cadena ligera antes de la sustitución es preferentemente una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de un anticuerpo PM-1 humanizado. Además, es preferible introducir las sustituciones de aminoácidos de (α) a (ζ) descritas anteriormente en el anticuerpo PM-1 humanizado.

20 Los métodos de la presente divulgación para mejorar la estabilidad de un anticuerpo anti receptor de IL-6 comprenden al menos una cualquiera de las etapas de (α) a (ζ) descritas anteriormente. Específicamente, los métodos de la presente divulgación pueden comprender dos o más de las etapas de (α) a (ζ) descritas anteriormente. Además, los métodos de la presente divulgación pueden comprender otras etapas (por ejemplo, sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos distintas de las de (α) a (ζ) descritas anteriormente) siempre que comprendan una cualquiera de las etapas de (α) a (ζ) descritas anteriormente. Además, por ejemplo, la región constante puede comprender sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos.

30 <Métodos para reducir la inmunogenicidad de un anticuerpo anti receptor de IL-6>

La presente divulgación también se refiere a métodos para reducir la inmunogenicidad de un anticuerpo anti receptor de IL-6, en particular, un anticuerpo PM-1 humanizado, que comprenden la etapa de sustituir Arg por Lys en la posición 13, Gln por Glu en la posición 16, Thr por Ala en la posición 23 y/o Thr por Ser en la posición 30 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (HFR1). Los métodos de la presente divulgación para reducir la inmunogenicidad de un anticuerpo anti receptor de IL-6 pueden comprender otras etapas de la sustitución de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa de sustituir Thr por Ser en la posición 30 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (HFR1).

40 La presente divulgación se refiere además a métodos para reducir la inmunogenicidad de un anticuerpo anti receptor de IL-6, en particular, un anticuerpo PM-1 humanizado, que comprenden la etapa de sustituir Ala por Val en la posición 27 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90 (HFR3). Los métodos de la presente divulgación para reducir la inmunogenicidad de un anticuerpo anti receptor de IL-6 pueden comprender otras etapas de sustitución de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa de sustituir Ala por Val en la posición 27 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90 (HFR3).

El método para la sustitución de aminoácidos no está particularmente limitado. La sustitución puede conseguirse, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida descrita anteriormente o un método descrito en los Ejemplos.

50 La presente divulgación se refiere además a métodos para reducir la inmunogenicidad de anticuerpo, que comprenden convertir la FR3 de un anticuerpo anti receptor de IL-6, en particular, un anticuerpo PM-1 humanizado, H53/L28, o anticuerpo PF1, en una FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 128 o 129.

<Métodos para mejorar la estabilidad de anticuerpos en condiciones ácidas>

55 La presente divulgación también se refiere a métodos para mejorar la estabilidad de anticuerpos en condiciones ácidas, que comprenden la etapa de sustituir Met en la posición 276 (posición 397 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (IgG2) con otro aminoácido. Los métodos de la presente divulgación para mejorar la estabilidad de anticuerpos en condiciones ácidas pueden comprender otras etapas de sustitución de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa de sustituir Met en la posición 276 (posición 397 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 20 (IgG2) con otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución a Val. El método para sustitución de aminoácidos no está particularmente limitado. La sustitución puede conseguirse, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida descrita anteriormente o un método descrito en los Ejemplos.

El tipo de anticuerpo diana no está particularmente limitado; sin embargo, el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano, más preferentemente un anticuerpo PM-1 humanizado o una variante del mismo que comprende sustituciones, supresiones y/o inserciones.

5 <Métodos para reducir la heterogeneidad originada de la región bisagra de la región constante de IgG2>

La presente divulgación también se refiere a métodos para reducir la heterogeneidad de anticuerpos, que comprenden la etapa de sustituir Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración de EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración de EU) y/o Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (IgG2) con otros aminoácidos. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren sustituciones de Cys por Ser en la posición 14, Arg por Lys en la posición 16 y Cys por Ser en la posición 102. Los métodos de la presente divulgación para reducir la heterogeneidad de anticuerpos pueden comprender otras etapas de sustitución de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa de sustituir Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración de EU), Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración de EU) y/o Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (IgG2). El método para sustitución de aminoácidos no está particularmente limitado. Las sustituciones pueden conseguirse, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida descrita anteriormente o un método descrito en los Ejemplos. En la sustitución de aminoácidos, los tres aminoácidos descritos anteriormente pueden sustituirse o pueden sustituirse uno o dos (por ejemplo, las posiciones 14 y 102) de ellos.

El tipo de anticuerpo diana no está particularmente limitado; sin embargo, el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano, más preferentemente un anticuerpo PM-1 humanizado o una variante del mismo que comprende sustituciones, supresiones y/o inserciones.

25 <Métodos para reducir la heterogeneidad originada de supresión de los aminoácidos C terminales en una región constante de IgG2>

La presente divulgación también se refiere a métodos para reducir la heterogeneidad de anticuerpos, que comprenden la etapa de suprimir Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración de EU) y Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración de EU) en una región constante de IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. Los métodos de la presente divulgación para reducir la heterogeneidad de anticuerpos pueden comprender otras etapas de sustitución de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa de suprimir Gly en la posición 325 (posición 446 en el sistema de numeración de EU) y Lys en la posición 326 (posición 447 en el sistema de numeración de EU) en una región constante de IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. El método para sustitución de aminoácidos no está particularmente limitado. La sustitución puede conseguirse, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida descrita anteriormente o un método descrito en los Ejemplos.

El tipo de anticuerpo diana no está particularmente limitado; sin embargo, el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano, más preferentemente un anticuerpo PM-1 humanizado o una variante del mismo que comprende sustituciones, supresiones y/o inserciones.

45 <Métodos para reducir la unión de FcγR manteniendo al mismo tiempo la secuencia humana en la región constante de IgG2>

La presente divulgación también se refiere a métodos para reducir la unión de FcγR de un anticuerpo, que comprenden la etapa de sustituir Ala por Ser en la posición 209 (EU330), Pro por Ser en la posición 210 (EU331) y Thr por Ala en la posición 218 (EU339) en una región constante de IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. Los métodos de la presente divulgación para reducir la unión de FcγR de un anticuerpo pueden comprender otras etapas de sustitución de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa de sustituir Ala por Ser en la posición 209 (EU330), Pro por Ser en la posición 210 (EU331) y Thr por Ala en la posición 218 (EU339) en una región constante de IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. El método para sustitución de aminoácidos no está particularmente limitado. La sustitución puede conseguirse, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida descrita anteriormente o un método descrito en los Ejemplos.

<Métodos para mejorar la conservación en plasma sustituyendo aminoácidos de región constante de IgG2>

La presente divulgación también se refiere a métodos para mejorar la conservación en plasma de un anticuerpo, que comprende la etapa de sustituir His en la posición 147 (EU268), Arg en la posición 234 (EU355) y/o Gln en la posición 298 (EU419) en una región constante de IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. Los métodos de la presente divulgación para mejorar la conservación en plasma de un anticuerpo pueden comprender otras etapas de sustitución de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa anteriormente descrita. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefieren sustituciones de His por Gln en la posición 147 (EU268), Arg por Gln en la posición 234 (EU355) y Gln por Glu en la posición 298 (EU419).

La presente divulgación también se refiere a métodos para mejorar la conservación en plasma de un anticuerpo, que comprenden la etapa de sustituir Asn en la posición 313 (EU434) en una región constante de IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 o 151 (M58). El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Ala. Los métodos de la presente divulgación para mejorar la conservación en plasma de un anticuerpo pueden comprender otras etapas de sustitución de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa anteriormente descrita.

El tipo de anticuerpo diana no está particularmente limitado; sin embargo, el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano, más preferentemente un anticuerpo PM-1 humanizado o una variante del mismo que comprende sustituciones, supresiones y/o inserciones.

La presente divulgación también se refiere a métodos para reducir la heterogeneidad de anticuerpos originada de la región bisagra de IgG2, métodos para mejorar la estabilidad de anticuerpos en condiciones ácidas, métodos para reducir la heterogeneidad de anticuerpos originada del extremo C terminal y/o métodos para reducir la unión de FcγR de un anticuerpo, todos los cuales comprenden en una región constante de IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (M14ΔGK), las etapas de:

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

Los métodos de la presente divulgación pueden comprender otras etapas tales como sustitución y supresión de aminoácidos, siempre que comprendan las etapas descritas anteriormente. Los métodos para la sustitución y supresión de aminoácidos no están particularmente limitados. La sustitución y supresión pueden conseguirse, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida descrita anteriormente o un método descrito en los Ejemplos.

El tipo de anticuerpo diana no está particularmente limitado; sin embargo, es preferentemente un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano, más preferentemente un anticuerpo PM-1 humanizado o una variante del mismo que comprende sustituciones, supresiones y/o inserciones.

La presente divulgación también se refiere a métodos para reducir la heterogeneidad originada de la región bisagra de IgG2, métodos para mejorar la estabilidad de los anticuerpos en condiciones ácidas y/o métodos para reducir la heterogeneidad de los anticuerpos originada del extremo C terminal, todos los cuales comprenden en una región constante de IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (M31ΔGK), las etapas de:

- (a) sustituir Met por Val en la posición 276 (posición 397 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
- (b) sustituir Cys por Ser en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
- (c) sustituir Arg por Lys en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
- (d) sustituir Cys por Ser en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
- (e) sustituir Glu por Gly en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
- (f) sustituir Ser por Gly en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; y
- (g) suprimir Gly en la posición 325 y Lys en la posición 326 (posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración de EU, respectivamente) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

La presente divulgación también se refiere a métodos para reducir la heterogeneidad de anticuerpos originada de la región bisagra de IgG2, métodos para mejorar la conservación de anticuerpos en plasma y/o métodos para reducir la heterogeneidad de anticuerpos originada del extremo C terminal, todos los cuales comprenden en una región constante de IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (M58), las etapas de:

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

25 La presente divulgación también se refiere a métodos para reducir la heterogeneidad de anticuerpos originada de la región bisagra de IgG2, métodos para mejorar la conservación de anticuerpos en plasma y/o métodos para reducir la heterogeneidad de anticuerpos originada del extremo C terminal, todos los cuales comprenden en una región constante de IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (M73), las etapas de:

- 30 (a) sustituir Cys por Ser en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
- (b) sustituir Arg por Lys en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
- 35 (c) sustituir Cys por Ser en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
- (d) sustituir Glu por Gly en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
- (e) sustituir Ser por Gly en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
- 40 (f) sustituir His por Gln en la posición 147 (posición 268 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
- (g) sustituir Arg por Gln en la posición 234 (posición 355 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
- 45 (h) sustituir Gln por Glu en la posición 298 (posición 419 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20;
- (i) sustituir Asn por Ala en la posición 313 (posición 434 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; y
- (j) suprimir Gly en la posición 325 y Lys en la posición 326 (posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración de EU, respectivamente) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

50 La presente divulgación también se refiere a métodos para reducir la heterogeneidad originada de la región bisagra de IgG2, métodos para reducir la heterogeneidad de anticuerpos originada del extremo C terminal y/o métodos para reducir la unión de FcγR de un anticuerpo, todos los cuales comprenden, en una región constante de IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (M86ΔGK), las etapas de:

- 55 (a) sustituir Ala en la posición 209 (posición 330 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 con otro aminoácido;
- (b) sustituir Pro en la posición 210 (posición 331 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 con otro aminoácido;
- 60 (c) sustituir Thr en la posición 218 (posición 339 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 con otro aminoácido;
- (d) sustituir Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 con otro aminoácido;
- 65 (e) sustituir Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 con otro aminoácido;
- (f) sustituir Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 20 con otro aminoácido;

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

(h) sustituir Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 con otro aminoácido; y

(i) suprimir Gly en la posición 325 y Lys en la posición 326 (posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración de EU, respectivamente) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

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

La presente divulgación también se refiere a métodos para reducir la heterogeneidad originada de la región bisagra de IgG2 y/o métodos para reducir la heterogeneidad de anticuerpos originada del extremo C terminal, que comprenden en una región constante de IgG2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (M40ΔGK), las etapas de:

(a) sustituir Cys en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 con otro aminoácido;

(b) sustituir Arg en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 con otro aminoácido;

(c) sustituir Cys en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 con otro aminoácido;

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

(e) sustituir Ser en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 con otro aminoácido; y

(f) suprimir Gly en la posición 325 y Lys en la posición 326 (posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración de EU, respectivamente) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

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

Los métodos de la presente divulgación pueden comprender otras etapas tales como sustitución y supresión de aminoácidos, siempre que comprendan las etapas descritas anteriormente. Los métodos para sustitución y supresión de aminoácidos no están particularmente limitados. La sustitución y supresión pueden conseguirse, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida descrita anteriormente o un método descrito en los Ejemplos.

El tipo de anticuerpo diana no está particularmente limitado; sin embargo, es preferentemente un anticuerpo anti receptor de IL-6, más preferentemente un anticuerpo PM-1 humanizado o una variante del mismo que comprende sustituciones, supresiones y/o inserciones.

<Métodos para mejorar la estabilidad de una región constante de IgG4 en condiciones ácidas>

La presente divulgación también se refiere a métodos para mejorar la estabilidad de anticuerpos en condiciones ácidas, que comprende la etapa de sustituir Arg en la posición 289 (posición 409 en el sistema de numeración de EU) de una región constante de IgG4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (Mol. Immunol. ene 1993; 30(1): 105-8) con otro aminoácido. Los métodos de la presente divulgación para mejorar la estabilidad de anticuerpos en condiciones ácidas pueden comprender otras etapas de sustitución de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa de sustituir Arg en la posición 289 (posición 409 en el Sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (región constante de IgG4 humana) con otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere sustitución a Lys. El método para sustitución de aminoácidos no está particularmente limitado. La sustitución puede conseguirse, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida descrita anteriormente o un método descrito en los Ejemplos.

El tipo de anticuerpo diana no está particularmente limitado; sin embargo, el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano, más preferentemente un anticuerpo PM-1 humanizado o una variante del mismo que comprende sustituciones, supresiones y/o inserciones.

<Métodos para reducir la heterogeneidad originada de supresión de aminoácidos C terminales en una región constante de IgG4>

La presente divulgación también se refiere a métodos para reducir la heterogeneidad de un anticuerpo, que comprenden la etapa de suprimir Gly en la posición 326 (posición 446 en el sistema de numeración de EU) y Lys en la posición 327 (posición 447 en el sistema de numeración de EU) en una región constante de IgG4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (Mol. Immunol. ene 1993; 30(1): 105-8). Los métodos de la presente divulgación para reducir la heterogeneidad pueden comprender otras etapas de sustitución de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa de suprimir Lys en la posición 327 (posición 447 en el sistema de numeración de EU) y/o Gly en la posición 326 (posición 446 en el sistema de numeración de EU) en una región constante de IgG4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (Mol. Immunol. ene 1993; 30(1): 105-8). El método para sustitución de aminoácidos no está particularmente limitado. La sustitución puede conseguirse, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida descrito anteriormente o un método descrito en los Ejemplos.

El tipo de anticuerpo diana no está particularmente limitado; sin embargo, el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano, más preferentemente un anticuerpo PM-1 humanizado o una variante del mismo que comprende sustituciones, supresiones y/o inserciones.

La presente divulgación también se refiere a métodos para mejorar la estabilidad en condiciones ácidas, métodos para reducir la heterogeneidad originada del extremo C terminal y/o métodos para reducir la unión de FcγR de un anticuerpo, todos los cuales comprenden en una región constante de IgG4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (Mol. Immunol. ene 1993; 30 (1): 105-8) (M11ΔGK), las etapas de:

- (a) sustituir Cys por Ser en la posición 14 (posición 131 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;
- (b) sustituir Arg por Lys en la posición 16 (posición 133 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;
- (c) sustituir Glu por Gly en la posición 20 (posición 137 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;
- (d) sustituir Ser por Gly en la posición 21 (posición 138 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;
- (e) sustituir Arg por Thr en la posición 97 (posición 214 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;
- (f) sustituir Ser por Arg en la posición 100 (posición 217 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;
- (g) sustituir Tyr por Ser en la posición 102 (posición 219 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;
- (h) sustituir Gly por Cys en la posición 103 (posición 220 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;
- (i) sustituir Pro por Val en la posición 104 (posición 221 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;
- (j) sustituir Pro por Glu en la posición 105 (posición 222 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;
- (k) sustituir Glu por Pro en la posición 113 (posición 233 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;
- (l) sustituir Phe por Val en la posición 114 (posición 234 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;
- (m) sustituir Leu por Ala en la posición 115 (posición 235 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;
- (n) suprimir Gly en la posición 116 (posición 236 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;
- (o) sustituir Arg por Lys en la posición 289 (posición 409 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21; y
- (p) suprimir Gly en la posición 236 y Lys en la posición 237 (posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración de EU, respectivamente) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

Los métodos de la presente divulgación pueden comprender otras etapas, tales como sustitución y supresión de aminoácidos, siempre que comprendan las etapas descritas anteriormente. El método para sustitución y supresión de aminoácidos no está particularmente limitado. La sustitución y supresión pueden conseguirse, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida descrita anteriormente o un método descrito en los Ejemplos.

El tipo de anticuerpo diana no está particularmente limitado; sin embargo, el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano, más preferentemente un anticuerpo PM-1 humanizado o una variante del mismo que comprende sustituciones, supresiones y/o inserciones.

<Métodos para reducir la heterogeneidad originada de supresión de aminoácidos C terminales en una región

constante de IgG1>

La presente divulgación también se refiere a métodos para reducir la heterogeneidad del anticuerpo, que comprende la etapa de suprimir Gly en la posición 329 (posición 446 en el sistema de numeración de EU) y Lys en la posición 330 (posición 447 en el sistema de numeración de EU) en una región constante de IgG1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. Los métodos de la presente divulgación para reducir la heterogeneidad pueden comprender otras etapas de sustituciones de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa de suprimir Lys en la posición 330 (posición 447 en el sistema de numeración de EU) y Gly en la posición 329 (posición 446 en el sistema de numeración de EU) en una región constante de IgG1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. El método para sustitución de aminoácidos no está particularmente limitado. La sustitución puede conseguirse, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida descrita anteriormente o un método descrito en los Ejemplos.

<Métodos para mejorar la conservación en plasma sustituyendo aminoácidos de región constante de IgG1>

La presente divulgación se refiere a métodos para mejorar la conservación de anticuerpos en plasma, que comprende la etapa de sustituir Asn en la posición 317 (EU434) en una región constante de IgG1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 con otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, se prefiere la sustitución a Ala. Los métodos de la presente divulgación para mejorar la conservación en plasma pueden comprender otras etapas de sustitución de aminoácidos, siempre que comprendan la etapa anteriormente descrita.

La presente divulgación también se refiere a métodos para mejorar la conservación en plasma y/o métodos para reducir la heterogeneidad originada del extremo C terminal, ambos de los cuales comprenden, en una región constante de IgG1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 (M83), las etapas de:

- (a) sustituir Asn por Ala en la posición 317 (EU 434) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; y
- (b) suprimir Lys en la posición 330 (posición 447 en el sistema de numeración de EU) y Gly en la posición 329 (posición 446 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

El tipo de anticuerpo diana no está particularmente limitado; sin embargo, el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano, más preferentemente un anticuerpo PM-1 humanizado o una variante del mismo que comprende sustituciones, supresiones y/o inserciones.

Las regiones constantes de la presente divulgación descritas anteriormente pueden combinarse con cualquier región variable de anticuerpo, y preferentemente con regiones variables derivadas de anticuerpos contra receptor de IL-6 humano. Las regiones variables de anticuerpos contra receptor de IL-6 humano incluyen, por ejemplo, regiones variables de un anticuerpo PM-1 humanizado. Las regiones variables de un anticuerpo PM-1 humanizado pueden no comprender ninguna sustitución de aminoácidos o pueden comprender sustituciones tales como las descritas anteriormente.

La presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la presente divulgación. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación son útiles en el tratamiento de enfermedades asociadas con IL-6, tales como artritis reumatoide.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden formularse, además de los anticuerpos, con vehículos farmacéuticamente aceptables por métodos conocidos. Por ejemplo, las composiciones pueden usarse por vía parenteral, cuando los anticuerpos se formulan en una solución o suspensión estéril para inyección usando agua o cualquier otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las composiciones pueden formularse combinando apropiadamente los anticuerpos con vehículos o medios farmacéuticamente aceptables, específicamente, agua estéril o solución salina fisiológica, aceites vegetales, emulsionantes, agentes de suspensión, tensioactivos, estabilizantes, agentes saporíferos, excipientes, vehículos, conservantes, agentes aglutinantes y similares, mezclándolos a una dosis unitaria y forma requeridas por implementaciones farmacéuticas generalmente aceptadas. El contenido del principio activo en dicha formulación se ajusta de modo que pueda obtenerse una dosis apropiada dentro del intervalo requerido.

Pueden formularse composiciones estériles para inyección usando vehículos tales como agua destilada para inyección, de acuerdo con protocolos convencionales.

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

Los aceites incluyen aceites de sésamo y aceites de soja, y pueden combinarse con solubilizantes tales como bencil benzoato o alcohol bencílico. Estos también pueden formularse con tampones, por ejemplo, tampones de fosfato o tampones de acetato sódico; analgésicos, por ejemplo, clorhidrato de procaina; estabilizantes, por ejemplo, alcohol bencílico o fenol; o antioxidantes. Las inyecciones preparadas se separan típicamente en alícuotas en ampollas apropiadas.

La administración se lleva a cabo preferentemente por vía parenteral, y específicamente incluye inyección, administración intranasal, administración intrapulmonar y administración percutánea. Por ejemplo, pueden administrarse inyecciones por vía sistémica o por vía local mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal o inyección subcutánea.

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

Como se usa en el presente documento, los códigos de tres letras y una letra para aminoácidos respectivos son los siguientes:

Alanina: Ala (A)
 Arginina: Arg (R)
 Asparagina: Asn (N)
 Ácido aspártico: Asp (D)
 Cisteína: Cys (C)
 Glutamina: Gln (Q)
 Ácido glutámico: Glu (E)
 Glicina: Gly (G)
 Histidina: His (H)
 Isoleucina: Ile (I)
 Leucina: Leu (L)
 Lisina: Lys (K)
 Metionina: Met (M)
 Fenilalanina: Phe (F)
 Prolina: Pro (P)
 Serina: Ser (S)
 Treonina: Thr (T)
 Triptófano: Trp (W)
 Tirosina: Tyr (Y)
 Valina: Val (V)

Todos los documentos de la técnica anterior citados en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad.

Ejemplos

En el presente documento posteriormente, la presente invención se describe específicamente con referencia a los Ejemplos, pero no debe interpretarse como limitada a los mismos.

[Ejemplo 1] Mejora de la actividad de unión a antígeno mediante modificación de CDR usando tecnología de maduración de afinidad

Preparación de SR344

Se preparó una línea celular CHO que expresaba constitutivamente una secuencia de los aminoácidos 1 a 344 N terminales de IL-6R humano soluble (en lo sucesivo en el presente documento "SR344") presentada en J. Biochem. (1990) 108: 673-676 (Yamasaki *et al.*, Science (1988) 241: 825-828 (GenBank n.º X12830)).

SR344 se purificó a partir del sobrenadante de cultivo de células CHO que expresaban SR344 usando tres tipos de cromatografía en columna: cromatografía en columna Blue Sepharose 6 FF, cromatografía de afinidad con una columna con anticuerpos inmovilizados específicos para SR344 y cromatografía en columna de filtración en gel.

El sobrenadante de cultivo se cargó directamente en una columna Blue Sepharose 6 FF (GE Healthcare Bio-Sciences) equilibrada con tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), y la fracción no adsorbida se lavó exhaustivamente

usando el mismo tampón. Después, la columna se lavó con el mismo tampón que contenía KCl 300 mM. La proteína adsorbida se eluyó después usando el mismo tampón en presencia de KCl 300 mM con un gradiente de concentración lineal de KSCN de 0 a 0,5 M. Las fracciones eluidas con el gradiente de concentración de KSCN se analizaron mediante transferencia de Western usando un anticuerpo específico de SR344, y se recogieron fracciones que contenían SR344.

La columna con anticuerpos inmovilizados específicos de SR344 se preequilibró con solución salina tamponada con Tris (TBS). La fracción de SR344 obtenida en la primera etapa se concentró mediante ultrafiltración usando Amicon Ultra-15 (Millipore; punto de corte de peso molecular de 10 kDa), y se diluyó dos veces con TBS antes de cargarse en la columna. Después la columna se lavó con TBS, la proteína adsorbida se eluyó con tampón de glicina-HCl 100 mM (pH 2,5). Las fracciones eluidas se neutralizaron añadiendo Tris 1 M (pH 8,1). Las fracciones obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE para recoger fracciones que contenían SR344.

La fracción obtenida en la segunda etapa se concentró usando Amicon Ultra-15 (punto de corte de peso molecular de 10 kDa) y se cargó en una columna Superdex 200 (GE Healthcare Bio-Sciences) equilibrada con PBS. La fracción eluida como el pico principal se usó como la muestra purificada final de SR344.

Establecimiento de una línea celular BaF3 que expresa gp130 humano

Se estableció una línea celular BaF3 que expresaba gp130 humano mediante el procedimiento descrito posteriormente, para obtener una línea celular que prolifera de una manera dependiente de IL-6.

Se amplificó un ADNc de gp130 humano de longitud completa (Hibi *et al*, Cell (1990) 63: 1149-1157 (GenBank n.º NM_002184)) mediante PCR y se clonó en el vector de expresión pCOS2Zeo para construir pCOS2Zeo/gp130. pCOS2Zeo es un vector de expresión construido retirando la región de expresión del gen DHFR de pCHO1 (Hirata *et al*, FEBS Letter (1994) 356: 244-248) e insertando la región de expresión del gen de resistencia a zeocina. El ADNc de IL-6R humano de longitud completa se amplificó mediante PCR y se clonó en pcDNA3.1(+) (Invitrogen) para construir hIL-6R/pcDNA3.1 (+).

Se mezclaron 10 µg de pCOS2Zeo/gp130 con células BaF3 ($0,8 \times 10^7$ células) suspendidas en PBS, y después se sometieron a pulsos de 0,33 kV y 950 µFD usando Gene Pulser (Bio-Rad). Las células BaF3 que tenían el gen introducido por electroporación se cultivaron durante un día y una noche completos en medio RPMI 1640 (Invitrogen) complementado con interleucina 3 de ratón 0,2 ng/ml (Peprotech) y FBS 10 % (Hyclone) y se seleccionaron añadiendo medio RPMI 1640 complementado con interleucina-6 humana 100 ng/ml (R&D Systems), receptor de interleucina 6 soluble humana 100 ng/ml (R&D Systems) y FBS 10 % para establecer una línea celular BaF3 que expresaba gp130 humano (en lo sucesivo en el presente documento "BaF3/gp130"). Esta BaF3/gp130 prolifera en presencia de interleucina 6 humana (R&D Systems) y SR344, y por lo tanto puede usarse para evaluar la actividad de inhibición del crecimiento (o actividad neutralizante del receptor de IL-6) de un anticuerpo anti receptor de IL-6.

Construcción de una biblioteca de CDR modificadas

En primer lugar, un anticuerpo de PM-1 humanizado (Cancer Res. 15 feb 1993; 53 (4): 851-6) se convirtió en scFv. La región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera se amplificaron por PCR para preparar un PM-1 HL scFv humanizado que tenía la secuencia enlazadora GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 106) entre región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera.

Se construyeron dos tipos de bibliotecas mediante PCR usando el ADN que codifica PM-1 HL scFv humanizado preparado como un molde. Uno fue una biblioteca diana en la que uno de los aminoácidos en una CDR se diseñó como X, y el otro fue una biblioteca en la que solamente las secuencias de puntos calientes en una CDR se sustituyen con secuencias aleatorias. La biblioteca diana en la que uno de los aminoácidos en cada CDR se diseña como X se construyó de la siguiente manera. La parte de biblioteca se construyó mediante PCR usando un cebador que contenía NNS para incorporar los aminoácidos en la biblioteca, mientras que el resto se preparó mediante PCR convencional. Las dos se unieron entre sí mediante PCR de ensamblaje. En esta construcción, solamente una CDR se diversificó como una biblioteca (véase J. Mol. Biol. (1996) 256: 77-88). De forma similar, la biblioteca en la que solamente las secuencias de puntos calientes se sustituyeron con secuencias aleatorias se construyó mediante PCR usando un cebador que contenía NNS para todos los aminoácidos de puntos calientes. En esta construcción, se construyeron dos bibliotecas: una fue una biblioteca en la que solamente el punto caliente en la región variable de cadena pesada se diversificó, y la otra fue una biblioteca en la que solamente el punto caliente en región variable de cadena ligera se diversificó (véase Nature Biotechnology junio 1999; 17: 568-572).

Se construyó una biblioteca de presentación en ribosomas usando las bibliotecas descritas anteriormente descritas de acuerdo con J. Immunological Methods (1999) 231: 119-135. Para realizar traducción *in vitro* basada en el sistema de *E. coli* sin células, se unieron una secuencia de SDA (sitio de unión a ribosoma) y promotor T7 al extremo 5' y se ligó una secuencia de gen3 parcial como un enlazador de presentación en ribosomas al extremo 3' usando *Sfil*.

Selección de scFv de alta afinidad mediante presentación en ribosomas

Se llevó a cabo selección basada en presentación en ribosomas (Nature Biotechnology dic 2000; 18: 1287-1292). El SR344 preparado se biotiniló usando NHS-PEO4-Biotina (Pierce) y después se usó como un antígeno. Se realizó selección de velocidad de disociación para obtener scFv de alta afinidad con alta eficacia (JBC (2004) 279 (18): 18870-18877). Las concentraciones de antígeno biotinilado y antígeno competidor fueron 1 nM y 1 µM, respectivamente. El tiempo de competición en el cuarto ciclo fue de 10 O/N.

scFv: inserción en fagémido, actividad de unión a antígeno y análisis de secuencia

Se realizó PCR para reconstruir HL scFv usando el grupo de ADN molde obtenido en el cuarto ciclo y cebadores específicos. Después de la digestión con *SfiI*, el fragmento se insertó en el vector de fagémido pELBG lacI predigerido con *SfiI*. Se transformó XL1-Blue (Stratagene) con la construcción resultante. Usando las colonias producidas, se evaluó la actividad de unión a antígeno mediante ELISA de fagos y se analizó la secuencia de HL scFv. El ELISA de fagos se llevó a cabo usando placas recubiertas con SR344 a 1 µg/ml (J. Mol. Biol. (1992) 227: 381-388). Se analizaron clones que mostraban actividad de unión a SR344 con respecto a sus secuencias usando cebadores específicos.

Conversión de scFv a IgG, y expresión y purificación de IgG

Se realizó expresión de IgG usando vectores de expresión de células animales. Se sometieron clones enriquecidos con una mutación particular a PCR para amplificar sus regiones variables de cadena ligera y regiones variables de cadena pesada. Después de la digestión con *XhoI/NheI* y digestión con *EcoRI*, los ADN amplificados se insertaron en un vector de expresión de células animales. La secuencia de nucleótidos de cada fragmento de ADN se determinó usando un secuenciador de ADN (Secuenciador de ADN ABI PRISM 3730XL o Secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems)) usando el Kit de Secuenciación en Ciclos Terminador BigDye (Applied Biosystems) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto.

Expresión de anticuerpos de IgG convertido

Se realizó expresión de anticuerpos mediante el método descrito posteriormente. Se suspendieron células HEK293H derivadas de cáncer de riñón embrionario humano (Invitrogen) en DMEM (Invitrogen) complementado con FBS 10 % (Invitrogen). Las células (10 ml/placa; densidad celular de 5 a 6 x 10⁵ células/ml) se sembraron en placas para células adherentes (10 cm de diámetro; Corning) y se cultivaron en un incubador de CO₂ (37 °C, CO₂ 5 %) durante un día y una noche completos. Después, el medio se retiró mediante aspiración y se añadieron 6,9 ml de medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen). La mezcla de ADN plasmídico preparado (13,8 µg en total) se combinó con 20,7 µl de polietilenimina 1 µg/ml (Polysciences Inc.) y 690 µl de medio CHO-S-SFMII. En la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se añadió a las células en cada placa. Las células se incubaron en un incubador de CO₂ (a 37 °C en CO₂ 5 %) durante cuatro a cinco horas. Después, se añadieron 6,9 ml de medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen) a las placas, y las células se incubaron en un incubador de CO₂ durante tres días. Los sobrenadantes de cultivo se recogieron y se centrifugaron (aproximadamente 2000 g, cinco minutos, temperatura ambiente) para retirar las células, y se esterilizaron mediante filtro de 0,22 µm MILLEX^(R)-GV (Millipore). Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Purificación de anticuerpos de IgG convertido

Se añadieron 50 µl de rProteína A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) en TBS a los sobrenadantes de cultivo obtenidos, y las soluciones combinadas se mezclaron por inversión a 4 °C durante cuatro horas o más. Las soluciones se transfirieron a copas de filtro de 0,22 µm de Ultrafree^(R)-MC (Millipore). Después de lavar tres veces con 500 µl de TBS, la resina rProteína A Sepharose™ se suspendió en 100 µl de solución acuosa de acetato sódico 50 mM (pH 3,3), y la mezcla se incubó durante dos minutos para eluir el anticuerpo. Inmediatamente, el eluato se neutralizó añadiendo 6,7 µl de Tris-HCl 1,5 M (pH 7,8). La elución se llevó a cabo dos veces, produciendo 200 µl de anticuerpo purificado. La absorbancia a 280 nm se determinó usando Espectrofotómetro ND-1000 (NanoDrop) o espectrofotómetro DU-600 (Beckman) usando 2 o 50 µl de la solución de anticuerpo, respectivamente. La concentración de anticuerpo se calculó a partir del valor obtenido de acuerdo con la siguiente fórmula: [concentración de anticuerpo (mg/ml)] = (absorbancia x factor de dilución)/14,6 x 10.

Evaluación de los clones de IgG convertido con respecto a actividad neutralizante del receptor de IL-6 humano

La actividad neutralizante del receptor de IL-6 se evaluó usando BaF3/gp130 que prolifera de una manera dependiente del receptor de IL-6/IL-6. Después de tres lavados con RPMI1640 complementado con FBS 10 %, las células BaF3/gp130 se suspendieron a 5 x 10⁴ células/ml en RPMI 1640 complementado con interleucina 6 humana 60 ng/ml (TORAY), receptor de IL-6 humano soluble recombinante 60 ng/ml (SR344) y FBS 10 %. Las suspensiones celulares se distribuyeron (50 µl/pocillo) en placas de 96 pocillos (Corning). Después, los anticuerpos purificados se diluyeron con RPMI1640 que contenía FBS 10 %, y se añadieron a cada pocillo (50 µl/pocillo). Las células se cultivaron a 37 °C en CO₂ 5 % durante tres días. Se diluyó Reactivo WST-8 (Kit de Recuento Celular 8; Dojindo

Laboratories) dos veces con PBS. Inmediatamente después de añadirse 20 µl del reactivo a cada pocillo, se midió la absorbancia a 450 nm (longitud de onda de referencia: 620 nm) usando SUNRISE CLASSIC (TECAN). Después de cultivar durante dos horas, se midió de nuevo la absorbancia a 450 nm (longitud de onda de referencia: 620 nm). La actividad neutralizante del receptor de IL-6 se evaluó usando el cambio de absorbancia durante dos horas como un indicador.

Como resultado, se obtuvieron varios anticuerpos cuyas actividades eran mayores que la del anticuerpo PM-1 humanizado (tipo silvestre (WT)). Se muestran mutaciones en los anticuerpos cuyas actividades fueron mayores que la de WT en la Figura 4. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 1, la actividad neutralizante de RD_6 fue aproximadamente 50 veces mayor que WT con respecto a la concentración inhibidora al 100 %.

Análisis de afinidad basado en Biacore de los clones de IgG convertido

Los clones cuyas actividades eran mayores que la del tipo silvestre se analizaron con respecto a cinética de reacción de antígeno-anticuerpo usando Biacore T100 (Biacore). La interacción de antígeno-anticuerpo se midió inmovilizando de 1.800 a 2.600 UR (unidades de resonancia) de rec-Proteína A (Zymed) (en lo sucesivo en el presente documento "Proteína A") en una microplaca sensora, uniendo diversos anticuerpos con la microplaca, y después dejando fluir el antígeno sobre la microplaca como un analito. Se usaron diversas concentraciones de IL-6R sR humano recombinante (R&D Systems) (en lo sucesivo en el presente documento "rhIL-6sR") como el antígeno. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C. Los parámetros cinéticos, constante de velocidad de asociación k_a (1/Ms) y constante de velocidad de disociación k_d (1/s) se calcularon a partir de los sensogramas obtenidos por medición. Después, se determinó la K_D (M) basándose en las constantes de velocidad. Los parámetros respectivos se determinaron usando Software de Evaluación Biacore T100 (Biacore).

Como resultado, se obtuvieron varios anticuerpos que mostraban mayor afinidad que el anticuerpo PM-1 humanizado (tipo silvestre (WT)). Como ejemplo, se muestran sensogramas del tipo silvestre (WT) y RD_6 en las Figuras 2 y 3, respectivamente. El resultado del análisis de parámetros cinéticos reveló que RD_6 tenía aproximadamente 50 veces más afinidad que WT (Tabla 1). Además de RD_6, también se obtuvieron anticuerpos que mostraban afinidad docenas de veces mayor que WT. Se muestran mutaciones que dan como resultado mayor afinidad que WT en la Figura 4.

Tabla 1

MUESTRA	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
WT	2,8E+6	1,8E-3	6,5E-10
RD_6	2,3E+6	2,8E-5	1,2E-11

[Ejemplo 2] Mejora de la actividad de unión a antígeno mediante diversas combinaciones de modificaciones de CDR

Se combinaron mutaciones asociadas con fuerte actividad o alta afinidad para crear anticuerpos con actividad más fuerte y afinidad mayor.

Producción, expresión y purificación de anticuerpos modificados

Se modificaron aminoácidos en sitios seleccionados para producir anticuerpos modificados. Específicamente, se introdujeron mutaciones en la región variable preparada H(WT) (H(WT), SEQ ID NO: 107) y región variable L(WT) (L(WT), SEQ ID NO: 108) usando el Kit de Mutagénesis Dirigida QuikChange (Stratagene) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Después se confirmó que el fragmento génico de cadena pesada de anticuerpo insertado en un plásmido fue la secuencia de interés del gen de región variable de anticuerpo humanizado, el plásmido se digirió con *XhoI* y *NofI*. Se digirió un plásmido que contenía el fragmento génico de cadena ligera de anticuerpo como un inserto con *EcoRI*. Después, las mezclas de reacción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 1 %. Se purificó un fragmento de ADN del tamaño esperado (aproximadamente 400 pb) usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN) mediante el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. El ADN se eluyó con 30 µl de agua estéril. Después, el fragmento génico de cadena pesada de anticuerpo se insertó en un vector de expresión de células animales para construir el vector de interés de expresión de cadena pesada. Un vector de expresión para la cadena ligera también se construyó de la misma manera. Se llevó a cabo ligamiento usando el kit de ligamiento de ADN rápido (Roche Diagnostics). La cepa de *E. coli* DH5α (Toyobo) se transformó con los plásmidos. La secuencia de nucleótidos de cada fragmento de ADN se determinó con un secuenciador de ADN (Secuenciador de ADN ABI PRISM 3730XL o Secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems)) usando el Kit de Secuenciación de Ciclos Terminador BigDye (Applied Biosystems) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Los anticuerpos se expresaron usando los vectores de expresión construidos y se purificaron mediante el método descrito en el Ejemplo 1.

Evaluación de la actividad del receptor de IL-6 humano neutralizante

Los anticuerpos purificados se evaluaron con respecto a su actividad neutralizante mediante el método descrito en el Ejemplo 1. La actividad neutralizante se evaluó usando interleucina 6 humana 600 ng/ml (TORAY). Se obtuvieron varios anticuerpos nuevos con actividad más fuerte que WT. Las secuencias de CDR de los anticuerpos se muestran en la Figura 5. De ellos, el anticuerpo con la actividad más fuerte (denominado RDC_23) tiene RDC_5H como una cadena pesada y RDC_11L como una cadena ligera. La actividad neutralizante de RDC_23 se muestra en la Figura 6. Se demostró que la actividad de RDC_23 era aproximadamente 100 veces mayor que WT con respecto a la concentración inhibidora al 100 %. Se observó actividad neutralizante mejorada no solamente en RDC_23, que es un anticuerpo que tiene RDC_5H como una cadena pesada y RDC_11L como una cadena ligera, sino también en los anticuerpos RDC_2, RDC_3, RDC_4, RDC_5, RDC_6, RDC_7, RDC_8, RDC_27, RDC_28, RDC_29, RDC_30 y RDC_32, que tienen todos L(WT) como una cadena ligera y RDC_2H, RDC_3H, RDC_4H, RDC_5H, RDC_6H, RDC_7H, RDC_8H, RDC_27H, RDC_28H, RDC_29H, RDC_30H y RDC_32H como una cadena pesada, respectivamente, así como en un anticuerpo denominado RDC_11, que tiene H(WT) y RDC_11L como cadenas pesada y ligera, respectivamente. Se mostró por lo tanto que podrían obtenerse anticuerpos que tenían actividad neutralizante más fuerte combinando mutaciones descubiertas por maduración de afinidad. Además, ya que los anticuerpos que contienen dicha combinación de mutaciones tenían actividad neutralizante mejorada, también se esperaba que tuvieran afinidad mejorada.

Análisis de afinidad basado en Biacore usando proteína A

Por lo tanto, de los anticuerpos con actividad neutralizante mejorada, RDC_2, RDC_3, RDC_4, RDC_5, RDC_6, RDC_7, RDC_8, RDC_11 y RDC_23 se analizaron con respecto a cinética de reacción de antígeno-anticuerpo usando Biacore T100 (Biacore). La interacción de antígeno-anticuerpo se midió inmovilizando de 4400 a 5000 UR de rec-Proteína A (Zymed) inmovilizada en una microplaca sensora mediante el método de acoplamiento de amina, uniendo diversos anticuerpos en la microplaca y después dejando fluir el antígeno sobre la microplaca como un analito. Para el antígeno, se usaron diversas concentraciones de rhIL-6sR. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25 °C. Los parámetros cinéticos, constante de velocidad de asociación k_a (1/Ms) y constante de velocidad de disociación k_d (1/s) se calcularon a partir de los sensogramas obtenidos por medición. Después, se determinó la K_D (M) basándose en las constantes de velocidad. Los parámetros respectivos se determinaron usando Software de evaluación Biacore T100 (Biacore). El resultado mostró que RDC_2, RDC_3, RDC_4, RDC_5, RDC_6, RDC_7, RDC_8, RDC_11 y RDC_23, todos los cuales contenían una combinación de mutaciones, tenían un valor de K_D menor que RD_28 que contenía una única mutación (Tabla 2). El sensograma para RDC_23 que tiene una mayor afinidad que otros se muestra en la Figura 7.

Tabla 2

MUESTRA	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
RD_28	9,4E+05	1,1E-04	1,2E-10
RDC_2	1,1E+06	2,5E-05	2,2E-11
RDC_3	1,0E+06	3,7E-05	3,7E-11
RDC_4	1,1E+06	2,9E-05	2,7E-11
RDC_5	1,2E+06	2,8E-05	2,2E-11
RDC_6	1,2E+06	3,5E-05	2,9E-11
RDC_7	1,1E+06	4,2E-05	
RDC_8	1,4E+06	3,6E-05	2,5E-11
RDC_11	1,1E+06	7,0E-05	
RDC_23	1,2E+06	3,1E-05	2,5E-11

Este hallazgo sugiere que estos anticuerpos tienen mayores afinidades que los anticuerpos parentales que no tienen las combinaciones de mutaciones. Como en el caso de la actividad neutralizante, esto indica que pueden obtenerse anticuerpos que tienen mayor afinidad combinando mutaciones descubiertas por maduración de afinidad. Las secuencias de aminoácidos de variantes que tienen mayor actividad o afinidad que WT se muestran a continuación (las mutaciones en relación con WT están subrayadas).

(HCDR2)

SEQ ID NO: 45 YISYSGITNYPNPSLK

(HCDR3)

SEQ ID NO: 57 LLARATAMDY
SEQ ID NO: 58 VLARATAMDY

SEQ ID NO: 59 JLARATAMDY
 SEQ ID NO: 60 TLARATAMDY
 SEQ ID NO: 61 VLARITAMDY
 SEQ ID NO: 62 JLARITAMDY
 SEQ ID NO: 63 JLARITAMDY
 SEQ ID NO: 64 LLARITAMDY

(LCDR3)

SEQ ID NO: 79 GQGNRLPYT

Específicamente, un anticuerpo anti receptor de IL-6 con afinidad y actividad neutralizante notablemente mejoradas en comparación con WT pueden producirse diseñando el anticuerpo para tener Asn en la posición de aminoácido 9 en HCDR2, Leu, Val, Ile o Thr en la posición de aminoácido 1 en HCDR3, Ala o Ile en la posición de aminoácido 5 en HCDR3, Gly en la posición de aminoácido 1 en LCDR3 y Arg en la posición de aminoácido 5 en LCDR3.

Análisis de afinidad basado en Biacore usando proteína A/G

Se analizaron WT y RDC_23 con respecto a cinética de reacción de antígeno-anticuerpo usando Biacore T100 (Biacore). La interacción de antígeno-anticuerpo se midió inmovilizando proteína A/G Recomb purificada (Pierce) (en lo sucesivo en el presente documento "Proteína A/G") en una microplaca sensora, uniendo diversos anticuerpos en la microplaca, y después dejando fluir el antígeno como un analito sobre la microplaca. Se usaron diversas concentraciones de rhIL-6sR (R&D Systems) y receptor de IL-6 soluble recombinante (SR344 preparado en el Ejemplo 1) como el antígeno. La estructura de cadena de azúcar de rhIL-6sR producida por células de insecto infectadas con baculovirus es de tipo alta manosa. Por otro lado, se supone que la estructura de cadena de azúcar de SR344 producida por células CHO es del tipo de cadena de azúcar complejo con ácido siálico en su extremo. Ya que se supone que la estructura de cadena de azúcar del receptor de IL-6 soluble en un cuerpo humano real es del tipo de cadena de azúcar complejo con ácido siálico en su extremo, se espera que SR344 tenga una estructura más cercana a la del receptor de IL-6 soluble en el cuerpo humano. Por lo tanto, se llevó a cabo en este experimento un ensayo de comparación entre rhIL-6sR y SR344.

Los parámetros cinéticos, constante de velocidad de asociación k_a (1/Ms) y constante de velocidad de disociación k_d (1/s) se calcularon a partir de los sensogramas obtenidos por medición. Después, se determinó la K_D (M) basándose en las constantes de velocidad. Los parámetros respectivos se determinaron usando Software de Evaluación Biacore T100 (Biacore).

Se preparó una microplaca sensora inmovilizando aproximadamente 3000 UR de Proteína A/G en CM5 (Biacore) con el método de acoplamiento de amina. La cinética de la interacción entre los dos tipos de receptores de IL-6 solubles (rhIL-6sR y SR344) y los anticuerpos (WT y RDC_23) unidos a Proteína A/G se analizó usando la microplaca sensora preparada. El tampón de ejecución usado fue HBS-EP+, y el caudal fue de 20 μ l/min. Cada anticuerpo se preparó de modo que se unieran aproximadamente 100 UR del anticuerpo a Proteína A/G. Para el analito, se preparó rhIL-6sR a 0, 0,156, 0,313 y 0,625 μ g/ml usando HBS-EP+, mientras que SR344 se ajustó a 0, 0,0654, 0,131 y 0,261 μ g/ml. En la primera etapa de la medición, los anticuerpos de interés, WT y RDC_23, se unieron a la Proteína A/G, y se añadió una solución de analito a los mismos. Después de tres minutos de interacción, la solución se cambió con HBS-EP+ (Biacore), y la fase de disociación se supervisó durante diez minutos. Después de medición de la fase de disociación, la microplaca sensora se regeneró lavando con 10 μ l de glicina-HCl 10 mM (pH 1,5). La asociación, disociación y regeneración constituyeron un ciclo analítico. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 37 °C.

Se midieron WT y RDC_23 de acuerdo con el ciclo anterior. Los sensogramas resultantes para los dos tipos de receptores de IL-6 solubles, rhIL-6sR y SR344, se muestran en las Figuras 8, 9, 10 y 11. Los sensogramas obtenidos se analizaron cinéticamente usando Software de Evaluación Biacore T100, que es un software de análisis de datos específico para Biacore (Tabla 3). El resultado mostró que cuando se compararon rhIL-6sR y SR344, las afinidades tanto de WT como de RDC_23 por SR344 fueron de dos a tres veces más débiles. Tanto para rhIL-6sR como para SR344, RDC_23 tenía afinidades que estaban mejoradas de aproximadamente 40 a 60 veces en comparación con WT. Por lo tanto, se demostró que debido a la combinación de modificaciones de CDR respectivas obtenidas mediante maduración de afinidad, RDC_23 también tenía una afinidad notablemente mayor que WT por SR344 cuya estructura es supuestamente cercana a la del receptor de IL-6 soluble en el cuerpo humano. Todas las mediciones descritas en lo sucesivo en el presente documento en los Ejemplos se llevaron a cabo a 37 °C para analizar cinéticamente la reacción de antígeno-anticuerpo usando SR344 y proteína A/G.

Tabla 3

MUESTRA	ANALITO	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
WT	rhIL-6sR	1,3E+6	1,5E-3	1,2E-9
	SR344	4,9E+5	2,0E-3	4,0E-9
RDC_23	rhIL-6sR	1,6E+6	4,5E-5	2,8E-11
	SR344	6,4E+5	4,3E-5	6,7E-11

[Ejemplo 3] Generación de H53/L28 con conservación en plasma mejorada y riesgo de inmunogenicidad reducido mediante modificaciones de CDR y marco conservado

El anticuerpo obtenido humanizando un anticuerpo PM-1 de ratón (en lo sucesivo en el presente documento denominado "tipo silvestre" o "WT"; las cadenas pesada y ligera de WT se denominan "H(WT)" y "L(WT)", respectivamente) como se describe en Cancer Res. 15 feb 1993; 53(4): 851-6, se modificó para mejorar la conservación en plasma, reducir el riesgo de inmunogenicidad y aumentar la estabilidad. Las modificaciones se describen posteriormente. Para el fin de mejorar la conservación en plasma, las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de WT se modificaron para reducir el punto isoeléctrico.

Creación de un modelo de estructura tridimensional para el anticuerpo PM-1 humanizado

En primer lugar, para identificar restos de aminoácidos expuestos en la superficie de las regiones variables del anticuerpo PM-1 humanizado (H(WT)/L(WT)), se creó un modelo para el dominio Fv del anticuerpo obtenido humanizando un anticuerpo P-1 de ratón mediante modelización de homología usando el software MOE (Chemical Computing Group Inc.).

Selección de sitios de modificación para reducir el punto isoeléctrico del anticuerpo PM-1 humanizado

Un análisis detallado del modelo creado sugirió que de los aminoácidos expuestos en superficie en la secuencia de FR, H16, H43, H81, H105, L18, L45, L79 y L107 (numeración de Kabat; Kabat EA *et al*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH) y de los de la secuencia de CDR, H31, H64, H65, L24, L27, L53 y L55, eran candidatos potenciales para los sitios de modificación para reducir el punto isoeléctrico sin reducir la actividad o estabilidad.

Retirada de secuencias de ratón restantes del anticuerpo PM-1 humanizado

El anticuerpo PM-1 humanizado es un anticuerpo cuya secuencia se obtuvo humanizando el anticuerpo PM-1 de ratón (Cancer Res. 15 feb 1993; 53(4): 851-6). La cadena pesada del anticuerpo PM-1 humanizado se obtuvo injertando CDR en el nuevo marco conservado que es una región variable de anticuerpo humano. Sin embargo, las secuencias de ratón permanecen en H27, H28, H29, H30 y H71 en la cadena pesada para mantener la actividad. Desde la perspectiva del riesgo de inmunogenicidad, el mejor resultado se espera cuando se minimice el número de secuencias de ratón. Por lo tanto, los presentes inventores buscaron secuencias para convertir H27, H28, H29 y H30 en secuencias humanas.

Selección de sitios de modificación para mejorar la estabilidad del anticuerpo PM-1 humanizado

Los presentes inventores especularon que podría ser posible mejorar la estabilidad del anticuerpo PM-1 humanizado (H(WT)/L(WT)) sustituyendo serina por glicina en H65 (estabilización de la estructura de giro; estabilización mediante conversión en una secuencia de consenso de HCDR2), metionina por isoleucina en H69 (estabilización de la estructura de núcleo hidrófobo), leucina por serina en H70 (estabilización mediante reemplazo de resto expuesto en superficie con un resto hidrófilo), treonina por asparagina en H58 (estabilización mediante conversión en una secuencia consenso de HCDR2), treonina por serina en L93 (estabilización mediante reemplazo del resto expuesto en superficie con un resto hidrófilo) y serina por isoleucina en H107 (estabilización de la lámina P) en sus regiones variables y consideraron estas modificaciones como candidatos para aumentar la estabilidad.

Retirada de epítomos de linfocitos T predichos por ordenador del anticuerpo PM-1 humanizado

En primer lugar, las regiones variables del anticuerpo PM-1 humanizado (H(WT)/L(WT)) se analizaron usando TEPITOPE (Methods dic 2004; 34(4): 468-75). El resultado mostró que CDR2 de cadena ligera contenía muchos epítomos de linfocitos T que se unían con HLA. Por lo tanto, se llevó a cabo análisis de TEPITOPE para encontrar modificaciones que reducirían el riesgo de inmunogenicidad de la CDR2 de cadena ligera sin reducir la estabilidad, actividad de unión o actividad neutralizante. El resultado demostró que los epítomos de linfocitos T de unión a HLA pueden retirarse sin reducir la estabilidad, actividad de unión o actividad neutralizante sustituyendo treonina por glicina en L51 en la CDR2 de cadena ligera.

Selección de secuencias de marco conservado respectivas

Puede realizarse búsqueda de homología de las fases individuales usando una base de datos construida con los datos de secuencias de aminoácidos de anticuerpos humanos disponibles de las bases de datos públicas: base de datos de Kabat (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>) y base de datos de IMGT (<http://imgt.cines.fr/>). Desde las perspectivas de reducir el punto isoelectrico, retirar secuencias de ratón restantes y mejorar la estabilidad, se seleccionaron marcos conservados humanos buscando en la base de datos secuencias de marcos conservados humanos que contenían las modificaciones descritas anteriormente. El resultado mostró que el anticuerpo modificado H53/L28 cumplía los requisitos descritos anteriormente sin reducir la actividad de unión o actividad neutralizante cuando sus marcos conservados respectivos estaban constituidos por las secuencias indicadas posteriormente. La FUENTE indica los orígenes de las secuencias humanas. Los restos de aminoácidos subrayados en cada secuencia representan aminoácidos modificados en relación con WT.

Tabla 4

H53	FUENTE	SECUENCIA
FR1	Línea germinal: IMGT_hVH_4_b	QVQLQESGPGLVKPS ~~E~~ TL ~~S~~ LTCAVSGY ~~S~~ I ~~S~~
FR2	Blood 1996 88: 4620-4629	WVRQPPGEGLEWIG
FR3	Línea germinal: IMGT_hVH_4_b (EXCEPTO H71 Y H89 INDICADAS EN NEGRITA)	RVTI ~~S~~ RDTSKNQFSL ~~K~~ LSSVT ~~A~~ ADTAAYCAR
FR4	J IMMUNOL 142: 4027-4033 (1989)	WGEGTLVTVSS
L28	FUENTE	SECUENCIA
FR1	Immunology. ago 1988; 64(4):573-8	DIQMTQSPSSLSASVGD ~~S~~ VTITC
FR2	Línea germinal:IMGT_hVk_1D_B	WYQQKPGKAPE ~~L~~ LIY
FR3	Línea germinal:IMGT_hVk_6D_41	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLE ~~A~~ EDA ~~A~~ ATYYC
FR4	J. Exp. Med. 1997 185: 1435-1446	FGQGTKVEI ~~E~~

Además, la FR3 anteriormente descrita de H53 contiene una secuencia no humana; por lo tanto, es preferible reducir adicionalmente el riesgo de inmunogenicidad. Una modificación posible para reducir el riesgo de inmunogenicidad es una sustitución de secuencia que da como resultado un intercambio de Ala en H89 a Val (SEQ ID NO: 127). Además, ya que Arg en H71 en FR3 de H53 es importante para la actividad de unión (Cancer Res. 15 feb 1993; 53(4): 851-6), pueden producirse anticuerpos anti receptor de IL-6 humano que contienen cadenas pesadas y ligeras cuyos marcos conservados consisten en una secuencia completamente humana usando una secuencia de FR3 de la subclase VH1 humana (SEQ ID NO: 128) o la subclase VH3 humana (SEQ ID NO: 129) donde Arg en H71 está conservada.

Selección de secuencias de CDR respectivas

Las secuencias de CDR respectivas de H53/L28 se seleccionaron como se muestra posteriormente, a partir de las perspectivas de reducir el punto isoelectrico, mejorar la estabilidad y retirar epítopos de linfocitos T, y lo que es más importante, no reducir la actividad de unión o actividad neutralizante.

Tabla 5

H53	SECUENCIA
CDR1	<u>D</u> DHAW <u>S</u>
CDR2	YISYSGITN ~~N~~ YNSL ~~K~~ G
CDR3	SLARTTAMDY
L28	SECUENCIA
CDR1	QASQDISSYLN
CDR2	YGSELHS
CDR3	QQGN <u>S</u> LPYT

Construcción de vector de expresión para anticuerpo modificado, expresión y purificación del anticuerpo

Se construyó un vector de expresión para anticuerpo modificado, y el anticuerpo se expresó y purificó por el método

descrito en el Ejemplo 1. El anticuerpo PM-1 de ratón humanizado se modificó sucesivamente para tener las secuencias de marco conservado y CDR seleccionadas para vectores de mutagénesis para H(WT) y L(WT) del anticuerpo. Usando el vector de expresión de células animales que codifica H53/L28 obtenido finalmente (secuencias de aminoácidos de anticuerpos: H53, SEQ ID NO: 104; y L28, SEQ ID NO: 105) que tiene, las secuencias de marco conservado y CDR seleccionadas, H53/L28 se expresó y purificó, y se usó después en la evaluación descrita posteriormente.

Evaluación del anticuerpo modificado H53/L28 con respecto al punto isoelectrónico por isoelectroenfoque

Se analizaron anticuerpo WT y el modificado H53/L28 mediante isoelectroenfoque para evaluar el cambio en el punto isoelectrónico del anticuerpo completo provocado por las modificaciones de aminoácidos en las regiones variables. El procedimiento de isoelectroenfoque se describe posteriormente. Usando Casete Phastsystem (Amersham Biosciences), se rehidrató gel IEF seco Phast-Gel (Amersham Biosciences) durante aproximadamente 30 minutos en la solución de rehidratación indicada a continuación.

agua Milli-Q	1,5 ml
Pharmalyte 5-8 para IEF (Amersham Biosciences)	50 µl
Pharmalyte 8-10,5 para IEF (Amersham Biosciences)	50 µl

Se llevó a cabo electroforesis en PhastSystem (Amersham Biosciences) usando el gel rehidratado de acuerdo con el programa indicado a continuación. Las muestras se cargaron en el gel en la etapa 2. Se usó un kit de calibración para pl (Amersham Biosciences) como los marcadores de pl.

Etapas:	2000 V	2,5 mA	3,5 W	15 °C	75 Vh
Etapas:	200 V	2,5 mA	3,5 W	15 °C	15 Vh
Etapas:	2.000 V	2,5 mA	3,5 W	15 °C	410 Vh

Después de la electroforesis, el gel se fijó con TCA 20 %, y después se tiñó con plata usando el kit de tinción de plata, proteína (Amersham Biosciences), de acuerdo con el protocolo unido al kit. Después de tefir, el punto isoelectrónico de la muestra (el anticuerpo completo) se calculó a partir de los puntos isoelectrónicos de marcadores de pl. El resultado mostró que el punto isoelectrónico de WT era aproximadamente 9,3, y el punto isoelectrónico del anticuerpo modificado H53/L28 era de aproximadamente 6,5 a 6,7. La sustitución de aminoácidos en WT produjo H53/L28 cuyo punto isoelectrónico es aproximadamente 2,7 menor. El punto isoelectrónico teórico de las regiones variables de H53/L28 (secuencias de región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera) se calculó por GENETYX (GENETYX CORPORATION). El punto isoelectrónico teórico determinado fue de 4,52. Al mismo tiempo, el punto isoelectrónico teórico de WT fue de 9,20. Por lo tanto, la sustitución de aminoácidos en WT produjo H53/L28 que tenía una región variable cuyo punto isoelectrónico teórico es aproximadamente 4,7 menor.

Evaluación de H53/L28 con respecto a la actividad neutralizante de receptor de IL-6 humano

Se evaluaron WT y H53/L28 mediante el método descrito en el Ejemplo 1. El resultado se muestra en la Figura 12. La actividad del anticuerpo modificado H53/L28 para neutralizar BaF/gp130 mejoró varias veces en comparación con WT. Específicamente, la comparación de H53/L28 con WT reveló que el punto isoelectrónico podría reducirse mejorando al mismo tiempo la actividad neutralizante.

Análisis basado en Biacore de H53/L28 con respecto a la afinidad por receptor de IL-6 humano

Las afinidades de WT y H53/L28 por receptor de IL-6 humano se evaluaron por análisis cinético usando Biacore T100 (Biacore). La interacción de antígeno-anticuerpo se midió inmovilizando proteína A/G Recomb purificada (Pierce) (en lo sucesivo en el presente documento "Proteína A/G") en una microplaca sensora, uniendo diversos anticuerpos en la microplaca y después dejando fluir el antígeno sobre la microplaca como un analito. Se usaron diversas concentraciones de receptor de IL-6 soluble recombinante (SR344) como el antígeno. Las condiciones de medición fueron las mismas que se han descrito en el Ejemplo 2.

Los sensogramas obtenidos para WT y H53/L28 se muestran en la Figura 13. Se llevó a cabo análisis cinético usando software de análisis de datos específico de Biacore Software de Evaluación Biacore T100. El resultado se muestra en la Tabla 6. El resultado mostró que K_D en H53/L28 se redujo aproximadamente seis veces en comparación con WT, y esto significa que la afinidad se mejoró aproximadamente seis veces. Específicamente, la comparación de H53/L28 con WT reveló que la afinidad podría mejorarse seis veces reduciendo al mismo tiempo el punto isoelectrónico. Un análisis detallado sugirió que la mutación de aminoácidos que contribuía a la mejora de la afinidad fue la sustitución de treonina por glicina en L51. En otras palabras, se cree que la afinidad puede mejorarse sustituyendo treonina por glicina en L51.

Tabla 6

MUESTRA	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
WT	4,9E+5	2,0E-3	4,0E-9
H53/L28	7,6E+5	5, 2E-4	6,8E-10

Predicción de epítopos de linfocitos T en H53/L28 usando TEPITOPE

- 5 H53/L28 se analizó por TEPITOPE (Methods dic 2004; 34(4): 468-75). El resultado mostró que el número de péptidos de unión a HLA potenciales se reducía significativamente en H53/L28 en comparación con WT. Esto sugiere reducción del riesgo de inmunogenicidad en seres humanos.

[Ejemplo 4] Evaluación de la conservación en plasma de H53/L28

Evaluación del anticuerpo modificado H53/L28 con respecto a su farmacocinética en plasma en ratones normales

Para evaluar la conservación en plasma del anticuerpo modificado H53/L28 con punto isoelectrico reducido, se comparó la farmacocinética en plasma entre WT y el anticuerpo modificado H53/L28 usando ratones normales.

Se administró por vía intravenosa o por vía subcutánea una única dosis de WT o H53/L28 a 1 mg/kg a ratones (C57BL/6J; Charles River Japan, Inc.). La sangre se recogió antes de la administración y 15 minutos, 2 horas, 8 horas, 1 día, 2 días, 5 días, 7 días, 14 días, 21 días y 28 días después de la administración. Obsérvese que la sangre se recogió a los 15 minutos después de la administración solamente de los grupos con administración intravenosa. La sangre recogida se centrifugó inmediatamente a 4 °C y 15.000 rpm durante 15 minutos para obtener plasma. El plasma sanguíneo separado se almacena hasta su uso en un congelador a -20 °C o menor.

La concentración en el plasma de ratón se determinó por ELISA. En primer lugar, se biotiniló IL-6 sR humano recombinante (R&D Systems) usando Kit de sulfo-NFS-biotinilación EZ-Link™ (Pierce). El sIL-6R humano biotinilado se distribuyó a Placas Recubiertas con Estreptavidina de Alta Capacidad de Unión (HBC) Reacti-Bind (Pierce), y después se incubó a temperatura ambiente durante una hora o más. De este modo, se prepararon placas con sIL-6R humano inmovilizado como se ha descrito anteriormente. Se prepararon muestras de plasma de ratón y muestras convencionales (concentraciones en plasma: 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2, 0,1 y 0,05 µg/ml) y se distribuyeron en placas con sIL-6R humano inmovilizado. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante una hora, y después se añadió AP anti IgG humano (Sigma) para la reacción. Después del desarrollo del color usando el Sistema de Sustratos de Fosfatasa BluePhos Microwell (Kirkegaard & Perry Laboratories) como un sustrato, se midió la absorbancia a 650 nm con un lector de microplacas. Las concentraciones en plasma en los ratones se determinaron basándose en la absorbancia de la curva de calibración usando el software analítico SoftMax Pro (Molecular Devices). Los ciclos temporales para las concentraciones en plasma de WT y H53/L28 después de administración intravenosa y administración subcutánea se muestran en las Figuras 14 y 15, respectivamente.

Los datos de concentración en plasma-tiempo obtenidos se evaluaron por un análisis independiente de modelo usando el software de análisis farmacocinético WinNonlin (Pharsight) para estimar los parámetros farmacocinéticos (ABC, eliminación (CL) y semivida (T1/2)). T1/2 se estimó a partir de las concentraciones en plasma en los tres últimos puntos o los de la fase terminal seleccionados automáticamente por WinNonlin. Se calculó BA a partir de la relación de ABC después de administración subcutánea frente a ABC después de administración intravenosa. Los parámetros farmacocinéticos determinados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

	iv		SC		
	CL ml/h/kg	T1/2 día	CL/F ml/h/kg	T1/2 día	BA %
WT	0,177	18,5	0,180	14,7	113
H53/L28	0,102	23,5	0,086	29,7	121

La semivida (T1/2) de H53/L28 en plasma después de administración intravenosa se prolongó hasta aproximadamente 1,3 veces la de WT, mientras que la eliminación se redujo aproximadamente 1,7 veces. T1/2 de H53/L28 después de administración subcutánea se prolongó hasta aproximadamente dos veces la de WT, mientras que la eliminación se redujo aproximadamente 2,1 veces. Por lo tanto, la conservación de H53/L28 en plasma podría mejorarse significativamente reduciendo el punto isoelectrico de WT.

H53/L28 es un anticuerpo anti receptor de IL-6 humanizado con actividad de unión y actividad neutralizante mejoradas, riesgo de inmunogenicidad reducido y conservación en plasma significativamente mejorada en comparación con el anticuerpo PM-1 humanizado (WT). Por lo tanto, las modificaciones usadas para crear H53/L28

pueden ser muy útiles en el desarrollo de productos farmacéuticos.

[Ejemplo 5] Preparación del anticuerpo PF1

5 Construcción de vectores de expresión y mutagénesis para el anticuerpo PM-1 humanizado

Se introdujeron un total de cuatro mutaciones de CDR descubiertas en el Ejemplo 2 que mejoraron la afinidad de RDC_23 (dos de cada uno en las cadenas pesada y ligera) en H53/L28 creado en el Ejemplo 4. Las cadenas pesadas y ligeras obtenidas introduciendo las mutaciones de RDC_23 en H53/L28 se denominaron PF1_H y PF1_L, respectivamente. El anticuerpo modificado se preparó, se expresó y se purificó mediante el método descrito en el Ejemplo 1. Las secuencias de aminoácidos de PF1_H y PF1_L se muestran en SEQ ID NO: 22 y 23, respectivamente.

15 Evaluación con respecto a la actividad neutralizante del receptor de IL-6 humano

La actividad neutralizante del anticuerpo PF1 purificado se evaluó mediante el método descrito en el Ejemplo 1. La evaluación de la actividad neutralizante se llevó a cabo usando 600 ng/ml de interleucina-6 humana (TORAY). Las actividades neutralizantes de WT y PF1 se muestran en la Figura 16. Se demostró que PF1 tenía una actividad de aproximadamente 100 a 1.000 veces mayor que WT con respecto a concentración inhibidora al 100 %.

20 Análisis basado en Biacore del anticuerpo PF11 con respecto a la afinidad por receptor de IL-6 humano

Esta medición se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas en el Ejemplo 2. El tampón de ejecución usado fue HBS-EP+, y el caudal fue de 20 µl/min. Cada anticuerpo se preparó de modo que se unían aproximadamente 100 UR del anticuerpo con proteína A/G. Se preparó SR344 a 0, 0,065, 0,131 y 0,261 µg/ml usando HBS-EP+ y se usó como un analito. En la primera etapa de la medición, el anticuerpo en solución se unió a proteína A/G, y se permitió que la solución de analito interaccionara con el mismo. Después de tres minutos de interacción, la solución se cambió a HBS-EP+, y la fase de disociación se supervisó durante 10 o 15 minutos. Después de medición de la fase de disociación, la microplaca sensora se regeneró lavando con 10 µl de glicina-HCl 10 mM (pH 1,5). La asociación, disociación y regeneración constituyen un ciclo de análisis. Cada anticuerpo se midió de acuerdo con este ciclo.

El sensograma obtenido para PF1 se muestra en la Figura 17. El sensograma se analizó cinéticamente usando el software de análisis de datos específico de Biacore, Software de Evaluación Biacore T100. El resultado se muestra junto con los de WT y H53/L28 en la Tabla 8. El resultado mostró que la afinidad de PF1 era aproximadamente 150 veces mejor en comparación con WT. RDC_23 tiene una alta afinidad como resultado de combinación mediante maduración de afinidad y H53/L28 tiene una conservación en plasma prolongada y afinidad mejorada. Mediante la combinación de ambos, PF1 obtuvo una mayor afinidad que RDC_23 o H53/L28 mediante un efecto aditivo.

40 Tabla 8

MUESTRA	K_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
WT	4,9E+05	2,0E-03	4,0E-09
RDC_23	6,4E+05	4,3E-05	6,7E-11
H53/L28	7,6E+05	5,2E-04	6-8E-10
PF1	1,3E+06	3,5E-05	2,7E-11

Evaluación del anticuerpo PF1 con respecto a estabilidad térmica por DSC

Para evaluar la estabilidad térmica del anticuerpo PF1, se determinó el punto medio de desnaturalización térmica (valor de T_m) mediante DSC. Los anticuerpos purificados de WT y PF1 se dializaron frente a una solución de acetato sódico 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0 (EasySEP, TOMY). Se llevó a cabo medición de DSC a una velocidad de calentamiento de 1 °C/min de 40 °C a 100 °C a una concentración de proteínas de aproximadamente 0,1 mg/ml. El resultado mostró que la T_m del dominio Fab de WT era aproximadamente 94 °C y que la del dominio Fab de PF1 era de 91 °C. La T_m del dominio Fab de una molécula de anticuerpo de tipo IgG1 está en general dentro del intervalo de aproximadamente 60 °C a 85 °C (Biochem. Biophys. Res. Commun. 13 abr 2007; 355(3): 751-7; Mol Immunol. abr 2007; 44(11): 3049-60). Por lo tanto, la estabilidad térmica observada del anticuerpo PF1 fue extremadamente alta en comparación con las de moléculas de IgG1 típicas.

55 Evaluación del anticuerpo PF1 con respecto a estabilidad a altas concentraciones

El anticuerpo PF1 se evaluó con respecto a estabilidad en formulaciones de alta concentración. Se dializaron anticuerpos WT y PF1 purificados frente a una solución de cloruro de histidina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5 (EasySEP, TOMY) y después se concentraron mediante ultrafiltros. Los anticuerpos se ensayaron con respecto a estabilidad a altas concentraciones. Las condiciones fueron las siguientes.

Anticuerpos: WT y PF1

Tampón: cloruro de histidina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0

Concentración: 145 mg/ml

Temperatura de almacenamiento y periodo temporal: 25 °C durante dos semanas, 25 °C durante cuatro semanas o 25 °C durante siete semanas

Método de evaluación de la agregación:

Sistema: Waters Alliance

Columna: G3000SWxl (TOSOH)

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

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

Se analizaron muestras diluidas 100 veces

Los contenidos de agregado en las formulaciones iniciales (inmediatamente después de la preparación) y formulaciones almacenadas en diversas condiciones se evaluaron por la cromatografía de filtración en gel descrita anteriormente. Se muestran diferencias (cantidades aumentadas) en el contenido de agregado en relación con las formulaciones iniciales en la Figura 18. Como resultado, se obtuvieron los siguientes hallazgos: (1) tanto WT como PF1 eran muy estable; (2) la cantidad de agregado que aumentó durante siete semanas a 25 °C fue de aproximadamente 0,7 % para WT y aproximadamente 0,3 % para PF1, lo que significa que la cantidad de agregado que aumentó al mes a 25 °C fue de aproximadamente 0,4 % y aproximadamente 0,17 %, respectivamente; y (3) PF1 era notablemente estable a altas concentraciones. El documento WO 2003/039485 ha desvelado datos sobre la estabilidad de Daclizumab, que está disponible como una formulación de IgG de alta concentración en el mercado, a 25 °C en una preparación 100 mg/ml. La cantidad de agregado que aumentó al mes a 25 °C es de aproximadamente 0,3 % en la formulación de Daclizumab 100 mg/ml. Incluso en comparación con Daclizumab, PF1 muestra una estabilidad excelente a altas concentraciones. El aumento del número de agregados es muy problemático en el desarrollo de formulaciones líquidas de alta concentración como productos farmacéuticos. Se demostró que el aumento de agregado de anticuerpo PF1 era muy pequeño incluso cuando la concentración del anticuerpo PF1 fue alta.

PF1 es una molécula que resulta de la modificación de WT. Los fines de la modificación incluyen mejora de la actividad de unión a antígeno, mejora de la conservación en plasma reduciendo su punto isoelectrico, reducción del riesgo de inmunogenicidad retirando epítomos de linfocitos T y retirando secuencias de ratón, y mejora de la estabilidad. De hecho, se demostró que la estabilidad de PF1 en preparaciones de 100 mg/ml o mayor concentración era muy alta incluso en comparación con WT. Pueden proporcionarse formulaciones de alta concentración estables y altamente convenientes para administración subcutánea usando dichas moléculas.

[Ejemplo 6] Ensayo de PK/PD del anticuerpo PF1 usando ratones transgénicos para el receptor de IL-6 humano

Ensayo para farmacocinética (cinética *in vivo*) usando ratones transgénicos para el receptor de IL-6 humano

Se evaluaron WT y PF1 preparados en el Ejemplo 5 con respecto a su farmacocinética (cinética *in vivo*) en ratones transgénicos para el receptor de IL-6 humano (ratones hIL-6R tg; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 23 may 1995; 92(11): 4862-6) y su actividad neutralizante de receptor de IL-6 humano soluble *in vivo*. Se administraron por vía intravenosa WT y PF1 una vez a 10 mg/kg a ratones hIL-6R tg. Se recogió sangre antes de la administración y 15 minutos, dos, cuatro y ocho horas, un día, dos, cuatro y siete días después de la administración. La sangre recogida se centrifugó inmediatamente a 4 °C y 15.000 rpm durante 15 minutos para obtener plasma sanguíneo. El plasma separado se almacenó en un congelador a -20 °C o inferior hasta su uso.

Las concentraciones en el plasma de ratón se determinaron mediante ELISA. Se prepararon muestras convencionales a 6,4, 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2 y 0,1 µg/ml como concentraciones en plasma. Se distribuyeron muestras de plasma de ratón y muestras convencionales en inmunoplaques (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp (Nalge Nunc International)) inmovilizadas con F(ab')₂ IgG (específico de cadena γ) anti humano (Sigma). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante una hora, y después se añadieron posteriormente anti IgG humano de cabra BIOT (Southern Biotechnology Associates) y conjugado de fosfatasa alcalina-estreptavidina (Roche Diagnostics) para la reacción. Después del desarrollo del color usando el Sistema de Sustratos de Fosfatasa de BluePhos Microwell (Kirkegaard & Perry Laboratories) como sustrato, la absorbancia a 650 nm se midió con un lector de microplacas. Las concentraciones en el plasma de ratón, se determinaron basándose en la absorbancia de la curva de calibración usando el software analítico SoftMax Pro (Molecular Devices). Los ciclos temporales para las concentraciones en plasma de WT y PF1 se muestran en la Figura 19. La concentración de PF1 en plasma cuatro días después de la administración fue aproximadamente cinco veces mayor que WT. Esto sugiere que la conservación de PF1 en el plasma de ratones transgénicos para el receptor de IL-6 humano se mejora en comparación con WT.

Se ha demostrado que los ratones transgénicos para el receptor de IL-6 producen receptor de IL-6 humano soluble en circulación en plasma. Por lo tanto, la eficacia neutralizante del receptor de IL-6 soluble humano en plasma puede evaluarse administrando anticuerpos anti receptor de IL-6 humano a ratones transgénicos para el receptor de IL-6 humano.

La concentración de receptor de IL-6 soluble humano libre en plasma de ratón se determinó para evaluar el grado de neutralización de receptor de IL-6 humano soluble mediante la administración de WT o PF1. Se diluyeron 6 µl del plasma de ratón dos veces con un tampón de dilución que contenía BSA. El plasma diluido se cargó en una cantidad apropiada de resina Fast Flow de rProteína A Sepharose (GE Healthcare) secada en una copa de filtro de 0,22 µm (Millipore) y todos los anticuerpos de tipo IgG (IgG de ratón, anticuerpo anti receptor de IL-6 humano y complejo de anticuerpo anti receptor de IL-6 humano-receptor de IL-6 soluble humano) en el plasma se adsorbieron por la Proteína A. Después, la solución en la copa se centrifugó usando una centrifuga de alta velocidad para recoger la solución que atraviesa. Ya que la solución que atraviesa no contiene complejo de anticuerpo anti receptor de IL-6 humano unido a Proteína A-receptor de IL-6 humano soluble, la concentración de receptor de IL-6 soluble libre puede determinarse midiendo la concentración de receptor de IL-6 soluble humano en la solución que ha pasado. La concentración de receptor de IL-6 soluble se determinó usando IL-6 sR Humano Quantikine (R&D Systems). La concentración de receptor de IL-6 soluble libre en ratones se midió 4, 8, 24, 48, 96 y 168 horas después de la administración de WT o PF1 de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto.

El resultado se muestra en la Figura 20. En ambos casos de WT y PF1, la concentración de receptor de IL-6 soluble libre era de 10 ng/ml o menor, cuatro horas y hasta ocho horas después de la administración intravenosa de una única dosis de WT o PF1 a 10 mg/kg, lo que indica que el receptor de IL-6 soluble humano se neutralizaba. Sin embargo, aunque la concentración del receptor de IL-6 soluble libre era aproximadamente de 500 ng/ml 24 horas después de la administración de WT, era 10 ng/ml o menor después de la administración de PF1. Esto indica que PF1 neutraliza el receptor de IL-6 soluble humano de una manera más sostenible que WT.

Se creó PF1 combinando RDC_23 descubierto mediante maduración de afinidad y H53/L28 que mostraba propiedades mejoradas tales como conservación prolongada en plasma, y por lo tanto se predijo que era capaz de mostrar conservación prolongada en plasma y alta actividad neutralizante *in vivo*. De hecho, en comparación con WT, se demostró que PF1 era más sostenible en plasma y mostraba un efecto neutralizante prolongado en ratones transgénicos para el receptor de IL-6 humano que producían receptor de IL-6 soluble humano.

PF1 es superior a WT (anticuerpo PM-1 humanizado) con respecto a riesgo de inmunogenicidad y estabilidad en preparaciones de alta concentración, así como conservación en plasma y efecto neutralizante del receptor de IL-6 en ratones transgénicos para el receptor de IL-6 humano. Por lo tanto, las modificaciones hechas para crear PF1 pueden ser muy útiles en el desarrollo de productos farmacéuticos.

[Ejemplo 7] Mejora de la estabilidad de IgG2 e IgG4 en condiciones ácidas

Construcción de vectores de expresión para anticuerpos de receptor de IL-6 humanizados convertidos a IgG2 o IgG4 y expresión de los anticuerpos

Para reducir la actividad de unión a receptor de Fcγ, la región constante de anticuerpo PM-1 humanizado (Cancer Res. 15 feb 1993; 53 (4): 851-6), que es del isotipo IgG1, se sustituyó con IgG2 o IgG4 (Mol. Immunol. ene 1993; 30(1): 105-8) para generar moléculas WT-IgG2 (SEQ ID NO: 109) y WT-IgG4 (SEQ ID NO: 110). Se usó un vector de expresión en células animales para expresar los IgG. Se construyó un vector de expresión, en el que la región constante de anticuerpo PM-1 humanizado (IgG1) usado en el Ejemplo 1 se digirió con *NheI/NotI* y después se sustituyó con la región constante de IgG2 o IgG4 mediante ligamiento. La secuencia de nucleótidos de cada fragmento de ADN se determinó con un secuenciador de ADN (Secuenciador de ADN ABI PRISM 3730XL o Secuenciador de ADN ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems)) usando el Kit de Secuenciación de Ciclo Terminador BigDye (Applied Biosystems) de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto. Usando la cadena ligera WT, WT-IgG1, WT-IgG2 y WT-IgG4 se expresaron mediante el método descrito en el Ejemplo 1.

- (1) Cadena pesada de anticuerpo PM-1 humanizado (WT-IgG1), SEQ ID NO: 15 (secuencia de aminoácidos)
- (2) cadena pesada de WT-IgG2, SEQ ID NO: 109 (secuencia de aminoácidos)
- (3) cadena pesada de WT-IgG4, SEQ ID NO: 110 (secuencia de aminoácidos)

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

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

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

Los contenidos de agregado en las muestras purificadas obtenidas por elución con ácido clorhídrico se evaluaron

mediante análisis de cromatografía de filtración en gel.

Método de evaluación de agregación:

5 Sistema: Waters Alliance
 Columna: G3000SWxl (TOSOH)
 Fase móvil: fosfato sódico 50 mM, KCl 300 mM, pH 7,0
 Caudal, longitud de onda: 0,5 ml/min, 220 nm

10 El resultado se muestra en la Figura 21. Aunque el contenido de agregado en WT-IgG1 después de la purificación fue de aproximadamente 2 %, los de WT-IgG2 y WT-IgG4 después de purificación fueron de aproximadamente 25 %. Esto sugiere que IgG1 es estable frente a ácido durante la elución con ácido clorhídrico, y por el contrario, IgG2 e IgG4 son inestables y experimentan desnaturalización/agregación. Por lo tanto, se demostró que la estabilidad de IgG2 e IgG4 en condiciones ácidas era menor que la de IgG1. Se ha usado frecuentemente Proteína A para purificar moléculas de IgG y las moléculas de IgG se eluyen de proteína A en condiciones ácidas. Además, se lleva a cabo en general en condiciones ácidas inactivación de virus, que se requiere cuando se desarrollan moléculas de IgG como productos farmacéuticos. Es por lo tanto deseable que la estabilidad de moléculas de IgG en condiciones ácidas sea mayor. Sin embargo, se ha descubierto que la estabilidad de moléculas de IgG2 e IgG4 en condiciones ácidas es menor que la de IgG1, y sugiere por primera vez que hay un problema de desnaturalización/agregación en condiciones ácidas en el desarrollo de moléculas de IgG2 e IgG4 como productos farmacéuticos. Es deseable que este problema de desnaturalización/agregación se supere cuando se desarrollen como productos farmacéuticos. Hasta la fecha, sin embargo, no se ha publicado ningún informe sobre un método para resolver este problema mediante sustitución de aminoácidos.

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

Se ha demostrado que la estabilidad de moléculas de IgG2 e IgG4 en condiciones ácidas es menor que la de IgG1. Por lo tanto, se ensayaron formas modificadas de moléculas de IgG2 e IgG4 para mejorar la estabilidad en condiciones ácidas. De acuerdo con modelos para las regiones constantes de moléculas de IgG2 e IgG4, se pensó que uno de los factores desestabilizantes potenciales en condiciones ácidas era la inestabilidad en la interfaz de dominio CH3-CH3. Como resultado de diversos exámenes, se cree que la metionina en la posición 397 en el sistema de numeración de EU en IgG2 o arginina en la posición 409 en el sistema de numeración de EU en IgG4 desestabilizan la interfaz CH3/CH3. Después, se prepararon anticuerpos IgG2 e IgG4 modificados. Un anticuerpo IgG2 modificado comprende la sustitución de metionina por valina en la posición 397 en el sistema de numeración de EU (IgG2-M397V, SEQ ID NO: 111 (secuencia de aminoácidos)) y un anticuerpo IgG4 modificado comprende la sustitución de arginina por lisina en la posición 409 en el sistema de numeración de EU (IgG4-R409K, SEQ ID NO: 112 (secuencia de aminoácidos)).

Los métodos usados para construir vectores de expresión para los anticuerpos de interés, y expresar y purificar los anticuerpos, fueron iguales que los usados para la elución con ácido clorhídrico descrita anteriormente. Se llevó a cabo análisis cromatográfico de filtración en gel para estimar los contenidos de agregado en las muestras purificadas obtenidas por elución con ácido clorhídrico de Proteína A.

Método de evaluación de la agregación:

45 Sistema: Waters Alliance
 Columna: G3000SWxl (TOSOH)
 Fase móvil: fosfato sódico 50 mM, KCl 300 mM, pH 7,0
 Caudal, longitud de onda: 0,5 ml/min, 220 nm

50 El resultado se muestra en la Figura 21. Aunque el contenido de agregado en WT-IgG1 después de la purificación era de aproximadamente 2 %, los de WT-IgG2 y WT-IgG4 después de la purificación fueron de aproximadamente 25 %. Por el contrario, los contenidos de agregado en variantes con dominio CH3 modificado, IgG2-M397V e IgG4-R409K, eran comparables (aproximadamente 2 %) a los de IgG1. Este hallazgo demuestra que la estabilidad de un anticuerpo IgG2 o IgG4 en condiciones ácidas puede mejorarse sustituyendo metionina por valina de IgG2 en la posición 397 en el sistema de numeración de EU o arginina por lisina de IgG4 en la posición 409 en el sistema de numeración de EU, respectivamente. Además, las temperaturas de punto medio de desnaturalización térmica de WT-IgG2, WT-IgG4, IgG2-M397V y IgG4-R409K se determinaron por el mismo método que se ha descrito en el Ejemplo 5. El resultado mostró que el valor de T_m para el dominio CH3 modificado era mayor en IgG2-M397V e IgG4-R409K en comparación con WT-IgG2 y WT-IgG4, respectivamente. Esto sugiere que IgG2-M397V e IgG4-R409K también son superiores con respecto a estabilidad térmica en comparación con WT-IgG2 y WT-IgG4, respectivamente.

65 IgG2 e IgG4 se exponen a condición ácida en proceso de inactivación de virus y en el proceso de purificación usando Proteína A. Por lo tanto, la desnaturalización/agregación en los procesos anteriores fue problemática. Sin embargo, se descubrió que el problema podría resolverse usando IgG2-M397V e IgG4-R409K para las secuencias

de regiones constantes de IgG2 e IgG4. Por lo tanto, se reveló que estas modificaciones eran muy útiles en el desarrollo de productos farmacéuticos de anticuerpos IgG2 e IgG4. Además, también se demostró la utilidad de IgG2-M397V e IgG4-R409K mediante el hallazgo de que son superiores en estabilidad térmica.

5 [Ejemplo 8] Mejora de la heterogeneidad derivada de enlaces disulfuro en IgG2

Purificación de WT-IgG1, WT-IgG2 y WT-IgG4 mediante elución con ácido acético de Proteína A

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

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

20 Se analizaron WT-IgG1, WT-IgG2 y WT-IgG4 purificados con respecto a homogeneidad mediante cromatografía de intercambio catiónico.

Método de evaluación usando IEC:

25 Sistema: Waters Alliance
Columna: ProPac WCX-10 (Dionex)
Fase móvil

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

Caudal, longitud de onda: 0,5 ml/min, 280 nm
Gradiente B: 50 %-75 % (75 minutos) en el análisis de WT-IgG1

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

El resultado se muestra en la Figura 22. WT-IgG2 mostró más de un pico en el análisis de intercambio iónico mientras que WT-IgG1 y WT-IgG4 mostraron un único pico. Esto sugiere que la molécula de IgG2 es más heterogénea en comparación con IgG1 e IgG4. De hecho, se ha indicado que los isotipos de IgG2 tienen heterogeneidad derivada de enlaces disulfuro en la región bisagra (Chu GC *et al*, Pharm Res. 24 mar 2007; 24 (6): 1145-1156). Por lo tanto, también se supuso que los heteropicos de IgG2 mostrados en la Figura 22 eran sustancias deseadas/sustancias relacionadas derivadas de los enlaces disulfuro. Es difícil producir productos farmacéuticos de anticuerpos a gran escala manteniendo al mismo tiempo la diferencia en la heterogeneidad de una sustancia deseada/sustancias relacionadas entre producciones, y por lo tanto, las moléculas de anticuerpo para desarrollar como productos farmacéuticos son convenientemente sustancias que son tan homogéneas (menos heterogéneas) como sea posible. Para IgG2 de tipo silvestre, existe un problema de homogeneidad que es importante en el desarrollo de productos farmacéuticos de anticuerpo. De hecho, el documento US20060194280 (A1) ha mostrado que IgG2 natural proporciona diversos heteropicos como resultado de los enlaces disulfuro en análisis de cromatografía de intercambio iónico, y que la actividad biológica varía entre estos picos. El documento US20060194280 (A1) presenta replegamiento en el proceso de purificación como un método para combinar los heteropicos en uno solo, pero el uso de dicho proceso en la producción es costoso y complicado. Por lo tanto, un método preferido para combinar los heteropicos en uno solo se basa en la sustitución de aminoácidos. Aunque la heterogeneidad originada de enlaces disulfuro en la región bisagra debería superarse para desarrollar IgG2 como productos farmacéuticos, no se ha publicado ningún informe hasta la fecha sobre un método para resolver este problema mediante la sustitución de aminoácidos.

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

60 Como se muestra en la Figura 23, existen diversos patrones de enlace disulfuro potenciales para una molécula de IgG2. Posibles causas de la heterogeneidad derivada de la región bisagra de IgG2 fueron patrón diferencial del enlace disulfuro y cisteínas libres. IgG2 tiene dos cisteínas (en las posiciones 219 y 220 en el sistema de numeración de EU) en la región bisagra superior y cisteínas adyacentes a las dos cisteínas de bisagra superior incluyen cisteína en la posición 131 en el sistema de numeración de EU en el dominio CH1 de cadena pesada y cisteína C terminal de cadena ligera y dos cisteínas correspondientes en la bisagra superior de cadena pesada del compañero de dimerización. Específicamente, hay ocho cisteínas en total en las cercanías de la región bisagra superior de IgG2 cuando el anticuerpo está en la forma asociada de H2L2. Esta puede ser la razón para los diversos patrones heterogéneos debido a enlaces disulfuro erróneos y cisteínas libres.

La secuencia de región bisagra y el dominio CH1 de IgG2 se modificaron para reducir la heterogeneidad originada de la región bisagra de IgG2. Se realizaron exámenes para evitar la heterogeneidad de IgG2 debido a patrón diferencial de enlace disulfuro y cisteínas libres. El resultado del examen de diversos anticuerpos modificados sugirió que la heterogeneidad podría evitarse sin reducir la estabilidad térmica sustituyendo cisteína y arginina por serina y lisina en las posiciones 131 y 133 en sistema de numeración de EU, respectivamente, en el dominio CH1 de cadena pesada y sustituyendo cisteína por serina en la posición 219, numeración de EU, en la bisagra superior de cadena pesada de la secuencia de región constante de IgG2 de tipo silvestre (en lo sucesivo en el presente documento "IgG2-SKSC") (IgG2-SKSC, SEQ ID NO: 120). Estas sustituciones permitirían que IgG2-SKSC formara un enlace covalente homogéneo entre cadenas pesadas y ligeras, que es un enlace disulfuro entre la cisteína C terminal de la cadena ligera y cisteína en la posición 220 en el sistema de numeración de EU (Figura 24).

Los métodos descritos en el Ejemplo 1 se usaron para construir un vector de expresión para IgG2-SKSC y para expresar y purificar IgG2-SKSC. El IgG2-SKSC purificado e IgG2 de tipo silvestre (WT-IgG2) se analizaron con respecto a homogeneidad mediante cromatografía de intercambio catiónico. Método de evaluación usando IEC:

Sistema: Waters Alliance
Columna: ProPac WCX-10 (Dionex)
Fase móvil

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

Caudal, longitud de onda: 0,5 ml/min, 280 nm
Gradiente B: 50 %-100 % (75 minutos)

El resultado se muestra en la Fig. 25. Como se esperaba anteriormente, se ha mostrado que IgG2-SKSC se eluyó en un único pico mientras WT-IgG2 proporcionó múltiples picos. Esto sugiere que la heterogeneidad derivada de enlaces disulfuro en la región bisagra de IgG2 puede evitarse usando modificaciones tales como las usadas para generar IgG2-SKSC, lo que permite la formación de un único enlace disulfuro entre la cisteína C terminal de la cadena ligera y cisteína en la posición 220 en el sistema de numeración de EU. Las temperaturas de punto medio de desnaturalización térmica de WT-IgG1, WT-IgG2 e IgG2-SKSC se determinaron por los mismos métodos que se han descrito en el Ejemplo 5. El resultado mostró que WT-IgG2 proporcionaba un pico para el dominio Fab que tiene un valor de T_m menor que WT-IgG1, mientras que IgG2-SKSC no proporcionó dicho pico. Esto sugiere que IgG2-SKSC también es superior en estabilidad térmica en comparación con WT-IgG2.

Aunque se cree que IgG2 de tipo silvestre tiene un problema de homogeneidad que es importante en el desarrollo de productos farmacéuticos de anticuerpo, se descubrió que este problema podría resolverse usando IgG2-SKSC para la secuencia de región constante de IgG2. Por lo tanto, IgG2-SKSC es muy útil en el desarrollo de productos farmacéuticos de anticuerpos IgG2. Además, también se demostró la utilidad de IgG2-SKSC mediante el hallazgo de que es superior en estabilidad térmica.

[Ejemplo 9] Mejora de la heterogeneidad C terminal en moléculas de IgG

Construcción de un vector de expresión para anticuerpo ΔGK C terminal de cadena pesada de WT-IgG1

Existe un informe sobre la heterogeneidad de secuencia C terminal de anticuerpo, que resulta de la supresión del resto de aminoácido lisina C terminal y la amidación del grupo amino C terminal debido a la supresión de los dos aminoácidos C terminales glicina y lisina (Johnson KA *et al*, Anal. Biochem. 1 ene 2007; 360(1): 75-83). La ausencia de dicha heterogeneidad se prefiere cuando se desarrollan productos farmacéuticos de anticuerpo. De hecho, en el anticuerpo PM-1 humanizado TOCILIZUMAB, el componente principal es la secuencia que carece del aminoácido C terminal lisina, que está codificado por la secuencia de nucleótidos pero se suprime en la modificación postraducciona, y el componente menor que tiene la lisina también coexiste como heterogeneidad. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos C terminal se modificó para reducir la heterogeneidad C terminal. Específicamente, los presentes inventores modificaron la secuencia de nucleótidos de IgG1 de tipo silvestre para suprimir la lisina y glicina C terminales de la región constante de cadena pesada del IgG1, y evaluaron si la amidación del grupo amino C terminal podría suprimirse suprimiendo los dos aminoácidos C terminales glicina y lisina.

Se introdujeron mutaciones en la secuencia C terminal de la cadena pesada usando vector pB-CH que codificaba el anticuerpo PM-1 humanizado (WT) obtenido en el Ejemplo 1. La secuencia de nucleótidos que codifica Lys en la posición 447 y/o Gly en la posición 446 en el sistema de numeración de EU se convirtió en un codón de terminación introduciendo una mutación usando el Kit de Mutagénesis Dirigida QuikChange (Stratagene) de acuerdo con el método descrito en el manual de instrucciones adjunto. Por lo tanto, se construyeron vectores de expresión para anticuerpo modificado técnicamente para carecer del aminoácido C terminal lisina (posición 447 en el sistema de numeración de EU) y anticuerpo modificado técnicamente para carecer de los dos aminoácidos C terminales glicina y lisina (posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración de EU, respectivamente). Se obtuvieron anticuerpos ΔK y ΔGK C terminales de cadena pesada expresando las cadenas pesadas y la cadena ligera modificadas

técnicamente del anticuerpo PM-1 humanizado. Los anticuerpos se expresaron y purificaron por el método descrito en el Ejemplo 1.

Se analizó el anticuerpo ΔGK C terminal de cadena pesada purificado mediante cromatografía de intercambio catiónico de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se evaluó el efecto de la supresión C terminal sobre la heterogeneidad mediante análisis de cromatografía de intercambio catiónico usando el anticuerpo ΔGK C terminal de cadena pesada purificado de acuerdo con el método descrito posteriormente. Las condiciones de análisis de cromatografía de intercambio catiónico se describen posteriormente. Se compararon cromatogramas para anticuerpo PM-1 humanizado, anticuerpo ΔK C terminal de cadena pesada y anticuerpo ΔGK C terminal de cadena pesada.

Columna: ProPac WCX-10, 4 x 250 mm (Dionex)
Fase móvil

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

Caudal: 0,5 ml/min

Gradiente: B 25 % (5 minutos) → (105 minutos) → B 67 % → (1 minuto) → B 100 % (5 minutos)

Detección: 280 nm

El resultado de análisis para el anticuerpo PM-1 humanizado no modificado, anticuerpo ΔK C terminal de cadena pesada y anticuerpo ΔGK C terminal de cadena pesada se muestra en la Figura 26. De acuerdo con Chu GC *et al.*, Pharm Res. 24 mar 2007; 24(6): 1145-56, un pico básico con tiempo de conservación más prolongado que el del pico máximo contiene un extremo C terminal de cadena pesada con Lys en la posición 449 y un extremo C terminal de cadena pesada con Pro amidada en la posición 447. La intensidad del pico básico se redujo significativamente en el anticuerpo ΔGK C terminal de cadena pesada, mientras que no se observó ninguna reducción significativa tal en el anticuerpo ΔK C terminal de cadena pesada. Esto sugiere que la heterogeneidad C terminal de la cadena pesada puede reducirse solamente cuando se suprimen dos aminoácidos C terminales de la cadena pesada.

La temperatura de desnaturalización térmica del anticuerpo ΔGK C terminal de cadena pesada se determinó mediante DSC para evaluar el efecto de la supresión de los dos restos en el extremo C terminal de cadena pesada en la estabilidad térmica. Para la medición de DSC, el anticuerpo se dializó frente a tampón de ácido acético 20 mM (pH 6,0) que contenía NaCl 150 mM para cambiar el tampón. Después de desaireación exhaustiva, el anticuerpo PM-1 humanizado y soluciones de anticuerpo ΔGK C terminal de cadena pesada, y la solución de referencia (dializado externo) se encerraron en células calorimétricas, y se equilibraron térmicamente exhaustivamente a 40 °C. Después, las muestras se exploraron de 40 °C a 100 °C con una velocidad de aproximadamente 1 K/min. Los picos de desnaturalización resultantes se asignaron (Rodolfo *et al.*, Immunology Letters, 1999, p 47-52). El resultado mostró que la supresión C terminal no tuvo ningún efecto en la temperatura de desnaturalización térmica del dominio CH3.

Por lo tanto, la heterogeneidad originada del aminoácido C terminal puede reducirse sin afectar a la estabilidad térmica del anticuerpo suprimiendo la lisina y glicina C terminal de la región constante de cadena pesada al nivel de secuencia de nucleótidos. Ya que todas las regiones constantes de anticuerpos humanos IgG1, IgG2 e IgG4 contienen Gly y Lys en las posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración de EU en sus secuencias C terminales, también se espera que el método para reducir la heterogeneidad de aminoácidos C terminales en este ejemplo y otros sea aplicable a regiones constantes de IgG2 e IgG4 y variantes de las mismas.

[Ejemplo 10] Construcción de M14ΔGK con una nueva secuencia de región constante optimizada

Cuando un producto farmacéutico de anticuerpo dirige a la neutralización de un antígeno, las funciones efectoras tales como ADCC del dominio Fc son innecesarias y por lo tanto la unión con el receptor de Fcγ es innecesaria. Se supone que la unión con el receptor de Fcγ es desfavorable desde la perspectiva de la inmunogenicidad y el efecto adverso (Strand V *et al.*, Nat. Rev. Drug Discov. ene 2007; 6(1): 75-92; Gessner JE *et al.*, Ann. Hematol. jun 1998; 76(6): 231-48). No es necesario que el anticuerpo anti receptor de IL-6 humanizado IgG1 TOCILIZUMAB se una con el receptor de Fcγ, porque solo es necesario que se una específicamente con el receptor de IL-6 y neutralice su actividad biológica para usar como un agente terapéutico para enfermedades asociadas con IL-6, tales como artritis reumatoide.

Construcción y evaluación de M14ΔGK, una región constante optimizada, que no se une al receptor de Fcγ

Un posible método para alterar la unión con el receptor de Fcγ es convertir el anticuerpo IgG del isotipo IgG1 a isotipo IgG2 o IgG4 (Ann. Hematol. jun 1998; 76(6): 231-48). Como un método para eliminar completamente la unión con receptor de Fcγ, se ha presentado un método para introducir una modificación artificial en el dominio Fc. Por ejemplo, ya que las funciones efectoras de anticuerpo anti CD3 y anticuerpo anti CD4 provocan efectos adversos, se han introducido mutaciones de aminoácidos que no están presentes en la secuencia de tipo silvestre en la región de

unión a receptor de Fc γ del dominio Fc (Cole MS *et al.*, J. Immunol. 1 oct 1997; 159 (7): 3613-21; Reddy MP *et al.*, J. Immunol. 15 feb 2000; 164(4): 1925-1933), y los anticuerpos anti CDR y anti CD4 que no se unen al receptor de Fc γ resultantes están sometiéndose a ensayos clínicos (Strand V *et al.*, Nat. Rev. Drug Discov. ene 2007; 6(1): 75-92; Chau LA *et al.*, Transplantation 15 abr 2001; 71(7): 941-50). De acuerdo con otro informe (Kim SJ *et al.*, Mol Cells. 31 ago 2005; 20(1): 17-29 Revisión), pueden prepararse anticuerpos que no se unen con el receptor de Fc γ convirtiendo el dominio de unión a Fc γ R de IgG1 (en las posiciones 233, 234, 235, 236, 327, 330 y 331 en el sistema de numeración de EU) en la secuencia de IgG2 (en las posiciones 233, 234, 235 y 236 en el sistema de numeración de EU) o IgG4 (en las posiciones 327, 330 y 331 en el sistema de numeración de EU). Sin embargo, si todas las mutaciones anteriores se introducen en IgG1, se generarán nuevas secuencias peptídicas de nueve aminoácidos, que potencialmente actúan como péptidos de epítomos de linfocitos T no naturales, y esto aumenta el riesgo de inmunogenicidad. El riesgo de inmunogenicidad debería minimizarse en el desarrollo de productos farmacéuticos de anticuerpo.

Para superar el problema anterior, se tuvieron en cuenta modificaciones en la región constante de IgG2. En el dominio de unión Fc γ R de la región constante de IgG2, los restos en las posiciones 327, 330 y 331 en el sistema de numeración de EU son diferentes de la secuencia que no se une de IgG4, mientras que los de las posiciones 233, 234, 235 y 236 en el sistema de numeración de EU son aminoácidos de tipo sin unión. Por lo tanto, es necesario modificar los aminoácidos en las posiciones 327, 330 y 331 en el sistema de numeración de EU a la secuencia de IgG4 (G2Δa descrito en Eur J. Immunol. ago 1999; 29(8): 2613-24). Sin embargo, ya que el aminoácido en la posición 339 en el sistema de numeración de EU en IgG4 es alanina mientras que el resto correspondiente en IgG2 es treonina, una modificación sencilla de los aminoácidos en las posiciones 327, 330 y 331 en el sistema de numeración de EU a la secuencia de IgG4 genera de forma desfavorable una nueva secuencia peptídica de 9 aminoácidos, que actúa potencialmente como un péptido epítópico de linfocitos T no natural, y de este modo aumenta el riesgo de inmunogenicidad. Entonces, los presentes inventores descubrieron que la generación de una nueva secuencia peptídica podría evitarse mediante la introducción de la sustitución de treonina por alanina en la posición 339 en el sistema de numeración de EU en IgG2, además de la modificación descrita anteriormente.

Además de las mutaciones descritas anteriormente, se introdujeron otras mutaciones, y fueron la sustitución de metionina por valina en la posición 397 en el sistema de numeración de EU en IgG2, que se descubrió en el Ejemplo 7 que mejoraba la estabilidad de IgG2 en condiciones ácidas; y la sustitución de cisteína por serina en la posición 131 en el sistema de numeración de EU, la sustitución de arginina por lisina en la posición 133 en el sistema de numeración de EU, y la sustitución de cisteína por serina en la posición 219 en el sistema de numeración de EU, que se descubrió en el Ejemplo 8 que mejoraban la heterogeneidad originada de enlaces disulfuro en la región bisagra. Además, ya que las mutaciones en las posiciones 131 y 133 generan una secuencia peptídica nueva de 9 aminoácidos, que actúa potencialmente como un péptido epítópico de linfocitos T no natural, y de este modo generan el riesgo de inmunogenicidad, la secuencia peptídica alrededor de las posiciones 131 a 139 se convirtió en una secuencia humana natural introduciendo la sustitución de ácido glutámico por glicina en la posición 137 en el sistema de numeración de EU y la sustitución de serina por glicina en la posición 138 en el sistema de numeración de EU. Además, se suprimieron glicina y lisina en las posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración de EU del extremo C terminal de la cadena pesada para reducir la heterogeneidad C terminal. La secuencia de región constante que tiene todas las mutaciones introducidas se denominó M14ΔGK (M14ΔGK, SEQ ID NO: 24). Aunque hay una mutación de cisteína en la posición 219 a serina en M14ΔGK como una nueva secuencia peptídica de 9 aminoácidos que actúa potencialmente como un péptido epítópico de linfocitos T, el riesgo de inmunogenicidad se consideró muy bajo ya que la propiedad de aminoácido de serina es similar a la de cisteína. La predicción de inmunogenicidad por TEPITOPE también sugirió que no había ninguna diferencia en la inmunogenicidad.

Un vector de expresión para la secuencia de cadena pesada de anticuerpo cuya región variable fue WT y cuya región constante fue M14ΔGK (M14ΔGK, SEQ ID NO: 24; WT-M14ΔGK, SEQ ID NO: 113) se construyó por el método descrito en el Ejemplo 1. Un anticuerpo que tenía WT-M14ΔGK como cadena pesada y WT como cadena ligera se expresó y purificó por el método descrito en el Ejemplo 1.

Además, se construyó WT-M17ΔGK (M17ΔGK, SEQ ID NO: 116; WT-M17ΔGK, SEQ ID NO: 115) con el mismo método introduciendo mutaciones en la región constante de IgG1 en las posiciones 233, 234, 235, 236, 327, 330, 331 y 339 en el sistema de numeración de EU (G1Δab descrito en Eur J. Immunol. ago 1999; 29(8): 2613-24) para alterar la unión al receptor de Fc γ y suprimiendo los aminoácidos en las posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración de EU para reducir la heterogeneidad C terminal (Ejemplo 9). Se construyó un vector de expresión para WT-M11ΔGK (M11ΔGK, SEQ ID NO: 25; WT-M11ΔGK, SEQ ID NO: 114). En WT-M11ΔGK, se introdujeron mutaciones en la región constante de IgG4 en las posiciones 233, 234, 235 y 236 en el sistema de numeración de EU (G4Δb descrito en Eur J. Immunol. ago 1999; 29(8): 2613-24; esta modificación genera nuevamente secuencia no humana y de este modo aumenta el riesgo de inmunogenicidad) para reducir la unión a receptor Fc γ . Además de la modificación anterior, para reducir el riesgo de inmunogenicidad, se introdujeron mutaciones en las posiciones 131, 133, 137, 138, 214, 217, 219, 220, 221 y 222 en el sistema de numeración de EU de modo que el patrón de enlace disulfuro en la región bisagra fue igual que el de M14ΔGK; se introdujo una mutación en la posición 409 en el sistema de numeración de EU (Ejemplo 7) para mejorar la estabilidad en condiciones ácidas; y se suprimieron los aminoácidos en las posiciones 446 y 447 en el sistema de numeración de EU (Ejemplo 9) para reducir la heterogeneidad C terminal. Se usó WT-M17ΔGK o WT-M11ΔGK como la cadena pesada, y se usó WT como la

cadena ligera. Estos anticuerpos se expresaron y purificaron mediante el método descrito en el Ejemplo 1.

Evaluación de WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK y WT-M11ΔGK con respecto a la actividad de unión a receptor de Fcγ

La unión de FcγRI se evaluó mediante el procedimiento descrito posteriormente. Usando Biacore T100, se permitió que el receptor de Fcγ derivado de ser humano (en lo sucesivo en el presente documento "FcγRI") inmovilizado en una microplaca sensora interaccionara con IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK o M17ΔGK como un analito. Las cantidades de anticuerpo unido se compararon. La medición se realizó usando FcRIIA/CD64 humano recombinante (R&D Systems) como FcγRI derivado de ser humano, e IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK y M17ΔGK como muestras. FcγRI se inmovilizó en la microplaca sensora CM5 (Biacore) mediante el método de acoplamiento de amina. La cantidad final de hFcγRI inmovilizado fue de aproximadamente 13.000 UR. El tampón de ejecución usado fue HBS-EP+, y el caudal fue de 20 μl/min. La concentración de muestra se ajustó a 100 μg/ml usando HBS-EP+. El análisis incluyó dos etapas: dos minutos de fase de asociación en la que se inyectaron 10 μl de una solución de anticuerpo y los siguientes cuatro minutos de fase de disociación en los que la inyección se cambió con HBS-EP+. Después de la fase de disociación, la microplaca sensora se regeneró inyectando 20 μl de hidróxido sódico 5 mM. La asociación, disociación y regeneración constituyen un ciclo de análisis. Se inyectaron diversas soluciones de anticuerpo para obtener sensogramas. Como analitos, se inyectaron IgG4, IgG2, IgG1, M11, M14 y M17 en este orden. Esta serie de inyecciones se repitió dos veces. El resultado de la comparación de los datos sobre las cantidades determinadas de anticuerpo unido se muestra en la Figura 27. La comparación muestra que la cantidad de anticuerpo unido se reduce en el orden de: IgG1 > IgG4 >> IgG2 = M11ΔGK = M14ΔGK = M17ΔGK. Por lo tanto, se reveló que la unión de FcγRI de IgG2 de tipo silvestre, M11ΔGK, M14ΔGK y M17ΔGK era más débil que la de IgG1 e IgG4 de tipo silvestre.

La unión de FcγRIIa se evaluó por el procedimiento descrito posteriormente. Usando Biacore T100, se permitió que el receptor de Fcγ derivado de ser humano IIA (en lo sucesivo en el presente documento "FcγRIIa") inmovilizado en una microplaca sensora interaccionara con IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK o M17ΔGK como un analito. Las cantidades de anticuerpo unido se compararon. La medición se realizó usando FcRIIA/CD32a humano recombinante (R&D Systems) como FcγRIIa derivado de ser humano e IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK y M17ΔGK como muestras. FcγRIIa se inmovilizó en la microplaca sensora CM5 (Biacore) mediante el método de acoplamiento de amina. La cantidad final de FcγRIIa inmovilizado fue de aproximadamente 3.300 UR. El tampón de ejecución usado fue de HBS-EP+, y el caudal fue de 20 μl/min. Después, se inyectó el tampón de ejecución hasta que la línea basal se estabilizó. La medición se llevó a cabo después de estabilizarse la línea basal. Se permitió que el FcγRIIa inmovilizado interaccionara con un anticuerpo de cada isotipo de IgG (IgG1, IgG2 o IgG4) o anticuerpo con mutaciones introducidas (M11ΔGK, M14ΔGK o M17ΔGK) como un analito. Se observó la cantidad de anticuerpo unido. El tampón de ejecución usado fue HBS-EP+, y el caudal fue de 20 μl/min. La temperatura de medición fue de 25 °C. La concentración de cada IgG o forma modificada del mismo se ajustó a 100 μg/ml. Se inyectaron 20 μl de un analito y se permitió que interaccionaran con el FcγRIIa inmovilizado. Después de la interacción, el analito se disoció de FcγRIIa y la microplaca sensora se regeneró inyectando 200 μl del tampón de ejecución. Como analitos, IgG4, IgG2, IgG1, M11ΔGK, M14ΔGK y M17ΔGK se inyectaron en este orden. Esta serie de inyecciones se repitió dos veces. El resultado de la comparación de datos sobre las cantidades de anticuerpo unido determinadas se muestra en la Figura 28. La comparación muestra que la cantidad de anticuerpo unido se reduce en el orden de: IgG1 > IgG2 = IgG4 > M11ΔGK = M14ΔGK = M17ΔGK. Por lo tanto, se reveló que la unión de FcγRIIa de M11ΔGK, M14ΔGK y M17ΔGK era más débil que la de IgG1, IgG2 e IgG4 de tipo silvestre.

La unión de FcγRIIb se evaluó mediante el procedimiento descrito posteriormente. Usando Biacore T100, se permitió que el receptor Fcγ IIB derivado de ser humano (en lo sucesivo en el presente documento "FcγRIIb") inmovilizado en una microplaca sensora interaccionara con IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK o M17ΔGK como un analito. Las cantidades de anticuerpo unido se compararon. La medición se realizó usando FcRIIB/C humano recombinante (R&D Systems) como FcγRIIb derivado de ser humano e IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK y M17ΔGK como muestras. FcγRIIb se inmovilizó en la microplaca sensora CM5 (Biacore) mediante el método de acoplamiento de amina. La cantidad final de FcγRIIb inmovilizado fue de aproximadamente 4.300 UR. Después, se inyectó el tampón de ejecución hasta que se estabilizó la línea basal. La medición se llevó a cabo después de estabilizarse la línea basal. Se permitió que el FcγRIIb inmovilizado interaccionara con un anticuerpo de cada isotipo de IgG (IgG1, IgG2 o IgG4) o anticuerpo con mutaciones introducidas (M11ΔGK, M14ΔGK o M17ΔGK) como un analito. Se observó la cantidad de anticuerpo unido. El tampón de ejecución usado fue HBS-EP+ (HEPES 10 mM, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, Tensioactivo P20 0,05 % v/v), y el caudal fue de 20 μl/min. La temperatura de medición fue de 25 °C. La concentración de cada IgG o forma modificada del mismo se ajustó a 200 μg/ml. Se inyectaron 20 μl de un analito y se permitió que interaccionara con el FcγRIIb inmovilizado. Después de la interacción, el analito se disoció de FcγRIIb y la microplaca sensora se regeneró inyectando 200 μl del tampón de ejecución. Como analitos, se inyectaron IgG4, IgG2, IgG1, M11ΔGK, M14ΔGK y M17ΔGK en este orden. Esta serie de inyección se repitió dos veces. El resultado de la comparación de datos sobre las cantidades de anticuerpo unido determinadas se muestra en la Figura 29. La comparación muestra que la cantidad de anticuerpo unido se reduce en el orden de: IgG4 > IgG1 > IgG2 > M11ΔGK = M14ΔGK = M17ΔGK. Por lo tanto, se reveló que la unión de FcγRIIb de M11ΔGK, M14ΔGK y M17ΔGK era más débil que la de IgG1, IgG2 e IgG4 de tipo silvestre.

La unión de FcγRIIIa se evaluó mediante el procedimiento descrito posteriormente. Usando Biacore T100, se permitió que el receptor Fcγ IIIa derivado de ser humano (en lo sucesivo en el presente documento "FcγRIIIa") inmovilizado en una microplaca sensora interaccionara con IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK o M17ΔGK como un analito. Las cantidades de anticuerpo unido se compararon. La medición se realizó usando hFcγRIIIaV-His6 (hFcγRIIIaV-His6 recombinante preparado en la compañía de los solicitantes) como FcγRIIIa derivado de ser humano e IgG1, IgG2, IgG4, M11ΔGK, M14ΔGK y M17ΔGK como muestras. FcγRIIIa se inmovilizó en la microplaca sensora CM5 (Biacore) por el método de acoplamiento de amina. La cantidad final de hFcγRIIIaV-His6 inmovilizado fue de aproximadamente 8200 UR. El tampón de ejecución usado fue HBS-EP+, y el caudal fue de 5 µl/min. La concentración de muestra se ajustó a 250 µg/ml usando HBS-EP+. El análisis incluyó dos etapas: dos minutos de fase de asociación en la que se inyectaron 10 µl de una solución de anticuerpo y los cuatro minutos posteriores de fase de disociación en los que la inyección se cambió con HBS-EP+. Después de la fase de disociación, la microplaca sensora se regeneró inyectando 20 µl de ácido clorhídrico 5 mM. La asociación, disociación y regeneración constituyen un ciclo de análisis. Se inyectaron diversas soluciones de anticuerpo para obtener sensogramas. Como analitos, se inyectaron IgG4, IgG2, IgG1, M11ΔGK, M14ΔGK y M17ΔGK en este orden. El resultado de la comparación de datos sobre las cantidades determinadas de anticuerpo unido se muestra en la Figura 30. La comparación muestra que la cantidad de anticuerpo unido se reduce en el orden de: IgG1 >> IgG4 > IgG2 > M17ΔGK > M11ΔGK = M14ΔGK. Por lo tanto, se reveló que la unión de FcγRIIIa de M11ΔGK, M14ΔGK y M17ΔGK era más débil que la de IgG1, IgG2 e IgG4 de tipo silvestre. Además, se descubrió que la unión de FcγRIIIa de M11ΔGK y M14ΔGK era más débil que la de M17ΔGK que contenía la mutación G1Δab presentada en Eur. J. Immunol. ago 1999; 29(8): 2613-24.

El hallazgo descrito anteriormente demuestra que la unión del receptor Fcγ de WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK y WT-M11ΔGK se reduce notablemente en comparación con IgG1 de tipo silvestre. El riesgo de inmunogenicidad debido a internalización mediada por receptor de Fcγ en APC y efectos adversos provocados por la función efectora tal como ADCC pueden evitarse usando WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK o WT-M11ΔGK como una región constante. Por lo tanto, WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK y WT-M11ΔGK son útiles como secuencia de región constante de productos farmacéuticos de anticuerpo dirigidos a antígenos neutralizantes.

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

Se evaluaron con respecto a estabilidad a altas concentraciones WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK y WT-M11ΔGK. Los anticuerpos purificados de WT-IgG1, WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK y WT-M11ΔGK se dializaron frente a una solución de cloruro de histidina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5 (EasySep, TOMY) y después se concentraron por ultrafiltradores. Los anticuerpos se ensayaron con respecto a estabilidad a altas concentraciones. Las condiciones fueron las siguientes.

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

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

Concentración: 61 mg/ml

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

Método de evaluación de agregación:

Sistema: Waters Alliance

Columna: G3000SWXL (TOSOH)

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

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

Se analizaron muestras diluidas 100 veces

Los contenidos de agregado en las formulaciones iniciales (inmediatamente después de la preparación) y formulaciones almacenadas en diversas condiciones se estimaron por cromatografía de filtración en gel descrita anteriormente. Las diferencias (cantidades aumentadas) en la cantidad de agregado en relación con las formulaciones iniciales se muestran en la Figura 31. El resultado mostró que las cantidades de agregado en WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK y WT-M11ΔGK aumentaron solamente de forma ligera en comparación con WT-IgG1 y eran aproximadamente la mitad del contenido en WT. Además, como se muestra en la Figura 32, la cantidad de fragmento Fab aumentado fue comparable entre WT-IgG1 y WT-M17ΔGK, mientras que las cantidades aumentadas en WT-M14ΔGK y WT-M11ΔGK eran aproximadamente un cuarto de la cantidad en WT. Las rutas de degeneración de formulaciones de anticuerpo de tipo IgG incluyen formación de agregado y generación de degradado de Fab como se describe en el documento WO 2003/039485. Basándose en los dos criterios, la agregación y la generación de fragmentos Fab, se demostró que WT-M14ΔGK y WT-M11ΔGK tenían una estabilidad superior en formulaciones en comparación con WT-IgG1. Por lo tanto, incluso para anticuerpos que tienen una región constante de IgG1 con escasa estabilidad y no podrían prepararse como productos farmacéuticos de anticuerpo en formulaciones líquidas de alta concentración, se esperaba que el uso de WT-M14ΔGK, WT-M17ΔGK o WT-M11ΔGK como una región constante permitiera la producción de formulaciones líquidas de alta concentración más estables.

En particular, se esperaba que M14ΔGK fuera muy útil como una secuencia de región constante nueva que (1) superaría la inestabilidad de la molécula de IgG2 original en condiciones ácidas; (2) mejoraría la heterogeneidad originada de enlaces disulfuro en la región bisagra; (3) no se uniría con el receptor de Fcγ; (4) tendría un número minimizado de secuencias peptídicas nuevas de 9 aminoácidos que potencialmente actuarían como péptidos epitópicos de linfocitos T; y (5) tendrían una mejor estabilidad que IgG1 en formulaciones de alta concentración.

[Ejemplo 11] Preparación de anticuerpo PF1-M14ΔGK

La región variable de PF1 (cuya región constante es IgG1) construida en el Ejemplo 5 se escindió usando *Xho*I y *Nhe*I. La región constante de M14ΔGK (cuya región variable es WT) construida en el Ejemplo 7 se escindió usando *Nhe*I y *Not*I. Los dos fragmentos de genes de cadena pesada de anticuerpos se insertaron en un vector de expresión de células animales para construir un vector de expresión para la cadena pesada de interés, PF1-M14ΔGK (PF1_H-M14ΔGK, SEQ ID NO: 117). La cadena ligera usada fue PF1_L. El anticuerpo PF1-M14ΔGK se expresó y se purificó mediante el método descrito en el Ejemplo 1.

El anticuerpo PF1-M14ΔGK fue superior en diversos aspectos en comparación con WT (anticuerpo PM-1 humanizado) y por lo tanto se esperaba que fuera muy útil como un producto farmacéutico de anticuerpo anti receptor de IL-6.

[Ejemplo 12] Preparación y evaluación de M31ΔGK

M14ΔGK preparado en el Ejemplo 10 se modificó sustituyendo los aminoácidos en las posiciones 330, 331 y 339 en el sistema de numeración de EU por la secuencia de IgG2 para construir M31ΔGK (M31ΔGK, SEQ ID NO: 118). Un vector de expresión para una secuencia de cadena pesada de anticuerpo cuya región variable es WT y la secuencia de región constante es M31ΔGK (WT-M31ΔGK, SEQ ID NO: 119) se construyó por el método descrito en el Ejemplo 1. Usando cadena pesada de WT-M31ΔGK y cadena ligera de WT, se expresó y purificó WT-M31 por el método descrito en el Ejemplo 1.

Además de WT-M31, WT-IgG2 y WT-M14ΔGK se expresaron y purificaron al mismo tiempo, y se analizaron mediante cromatografía de intercambio catiónico por el procedimiento descrito posteriormente. Las condiciones usadas en el análisis de cromatografía de intercambio catiónico fueron las siguientes. Se compararon los cromatogramas para WT-IgG2, WT-M14ΔGK y WT-M31ΔGK.

Columna: ProPac WCX-10, 4 x 250 mm (Dionex)
Fase móvil

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

Caudal: 0,5 ml/min
Gradiente: B 0 % (5 minutos) → (65 minutos) → B 100 % → (1 minuto)
Detección: 280 nm

El resultado del análisis para WT-IgG2, WT-M14ΔGK y WT-M31ΔGK se muestra en la Figura 33. Como WT-M14ΔGK, se demostró que WT-M31ΔGK se eluía como un único pico, mientras que WT-IgG2 proporcionó múltiples picos. Esto indica que la heterogeneidad derivada de enlaces disulfuro en la región bisagra de IgG2 también puede evitarse en WT-M31ΔGK.

[Ejemplo 13] Preparación de un anticuerpo completamente humanizado F2H/L39-IgG1

Humanización completa de la secuencia de marco conservado del anticuerpo PF1

Arginina en la posición 71 (numeración de Kabat; Kabat EA *et al*, 1991. Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH) es la única secuencia de ratón que permanece en PF1_H preparado en el Ejemplo 5. Esto no es preferible desde la perspectiva de la inmunogenicidad. En general, el resto de la posición 71 en la cadena pesada es una secuencia importante para la conformación de HCDR2. De hecho, se ha indicado que durante la generación del anticuerpo PM1 humanizado, el resto en la posición 71 es esencial para la actividad de unión del anticuerpo PM 1 de ratón. Se demostró que la actividad de unión se reducía significativamente sustituyendo valina en la posición 71 (Cancer Research (1993) 53: 851-856). Al mismo tiempo, se clasifica PF1_H en la familia de VH4 de genes de línea germinal humana, y valina en la posición 71 está altamente conservada en la familia de VH4. También se demostró que la actividad neutralizante estaba reducida significativamente sustituyendo arginina por valina en la posición 71.

Por lo tanto, para retirar completamente la secuencia de ratón manteniendo al mismo tiempo la arginina en la posición 71, los presentes inventores buscaron entre secuencias de genes de línea germinal humana y presentaron anticuerpos humanos para secuencias que tienen arginina en la posición 71 y comparten restos conservados importantes para el mantenimiento de la estructura terciaria del anticuerpo. Como resultado, los inventores

descubrieron una secuencia candidata que contiene restos conservados importantes aunque su homología con PF1_H es baja como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9

NUMERACIÓN DE KABAT		fuerce
PF1_H	R V T I S R D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A A Y Y C A R	Línea germinal: IMGT_hvH_4-
SECUENCIA CANDIDATA	R V T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R	(EXCEPTO H71 Y H89) Mol. Immunol. 44(4): 412-422 (2007)

H96-IgG1 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 134) se diseñó sustituyendo la región de las posiciones 66 a 94 en PF1_H-IgG1, numeración de Kabat, por la secuencia candidata anteriormente descrita. La región variable de anticuerpo se preparó mediante PCR (PCR de ensamblaje) usando una combinación de oligo ADN sintéticos. La región constante se amplificó a partir de un vector de expresión para IgG1 mediante PCR. La región variable y región constante de anticuerpo se unieron entre sí mediante PCR de ensamblaje, y después se insertaron en un vector de expresión de células animales. H96/PF1L-IgG1 se expresó y se purificó mediante el método descrito en el Ejemplo 1.

Evaluación de H96/PF1L-IgG1, un anticuerpo con marco conservado completamente humanizado

La T_m de H96/PF1L-IgG1 purificado se determinó mediante el método descrito en el Ejemplo 5. La medición de afinidad se llevó a cabo esencialmente en las mismas condiciones usadas en el Ejemplo 5. Obsérvese que la concentración de SR344 se ajustó a 0, 0,36 y 1,4 µg/ml, y la fase de disociación se supervisó durante 15 minutos. El resultado mostró que la T_m y afinidad de H96/PF1L-IgG1 fueron casi iguales que las de PF1-IgG1 (Tabla 10).

Tabla 10

	T _m (°C)	k _a (1/Ms)	k _d (1/s)	KD (M)
ANTICUERPO PF1	91,3	1,4E+06	4,2E-05	3,1E-11
H96/PF1L-IgG1	89,8	1,2E+06	4,8E-05	3,9E-11

Como se ha descrito anteriormente, los presentes inventores generaron un anticuerpo con un marco conservado de anticuerpo PF1 completamente humanizado, usando H96 para la cadena pesada de anticuerpo PF1 para retirar completamente la secuencia de ratón restante del anticuerpo PF1 manteniendo al mismo tiempo su T_m y afinidad. Ya que la secuencia de marco conservado de H96/PF1L-IgG1 no tiene ninguna secuencia derivada de ratón, se espera que H96/PF1L-IgG1 sea superior, especialmente desde la perspectiva de la inmunogenicidad.

Construcción de F2H/L39-IgG1 con punto isoeléctrico reducido y riesgo de inmunogenicidad atenuado

Como se ha demostrado en el Ejemplo 4, la conservación en plasma puede prolongarse reduciendo el punto isoeléctrico mediante modificación de aminoácidos en la región variable de anticuerpo. Por lo tanto, las sustituciones de aminoácidos mostradas posteriormente se introdujeron adicionalmente en H96-IgG1 construido anteriormente. Para reducir el punto isoeléctrico, se sustituyó lisina por glutamina en la posición 64, y se sustituyó glicina por ácido aspártico en la posición 65. Además, para reducir el riesgo de inmunogenicidad, se sustituyó ácido glutámico por glutamina en la posición 105 y se sustituyó treonina por isoleucina en la posición 107. Además, para conseguir potenciación de la afinidad tal como la del Ejemplo 2, se introdujo modificación en la que se sustituía valina por leucina en la posición 95 y se sustituía isoleucina por alanina en la posición 99. Para preparar F2H-IgG1 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 135), estas sustituciones de aminoácidos se introdujeron en H96-IgG1 por el método descrito en el Ejemplo 1.

Además, las siguientes sustituciones de aminoácidos se introdujeron en PF1L. Para reducir el punto isoeléctrico, se sustituyó glutamina por ácido glutámico en la posición 27 y se sustituyó leucina por ácido glutámico en la posición 55. Para preparar L39 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 136), estas sustituciones de aminoácidos se introdujeron en PF1L por el método descrito en el Ejemplo 1. Usando F2H-IgG1 como cadena pesada y L39 como cadena ligera, se expresó F2H/L39-IgG1 y se purificó por el método descrito en el Ejemplo 1.

Análisis basado en Biacore de F2H/L39-IgG1 con respecto a la afinidad por el receptor de IL-6 humano

Se analizaron anticuerpo PM1 humanizado (tipo silvestre (WT)), anticuerpo PF1 (construido en el Ejemplo 5) y F2H/L39-IgG1 con respecto a afinidad. Esta medición se llevó a cabo esencialmente en las mismas condiciones usadas en el Ejemplo 4. Obsérvese que la concentración de SR344 se ajustó a 0, 0,36 y 1,4 µg/ml, y la fase de disociación se supervisó durante 15 minutos (Tabla 11).

Tabla 11

MUESTRA	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)
PF1-IgG1	1,5E+06	4,4E-05	3,0E-11
F2H/L39-IgG1	7,7E+05	4,0E-05	5,2E-11

El resultado mostró que F2H/L39-IgG1 tenía muy fuerte afinidad (manteniendo una KD en el orden de 10^{-11}) pero su k_a se redujo hasta aproximadamente la mitad de la de PF1-IgG1.

5

Evaluación de F2H/L39-IgG1 con respecto a su actividad neutralizante del receptor de IL-6 humano

Las actividades neutralizantes de anticuerpo PM1 humanizado (tipo silvestre (WT)) y F2H/L39-IgG1 se evaluaron por el método descrito en el Ejemplo 1. La evaluación de la actividad neutralizante se llevó a cabo usando interleucina-6 humana 600 ng/ml (TORAY). Como se muestra en la Figura 34, se demostró que F2H/L39-IgG1 tenía una actividad muy fuerte, 100 o más veces mayor que WT con respecto a concentración inhibitoria al 100 %.

10

Evaluación de F2H/L39-IgG1 con respecto a su punto isoelectrico por isoelectroenfoque

El punto isoelectrico de F2H/L39-IgG1 se determinó mediante el método descrito en el Ejemplo 3. El punto isoelectrico de F2H/L39-IgG1 fue de 5,5, lo que sugiere que su conservación en plasma se prolongó debido a un punto isoelectrico menor en relación con el anticuerpo PF1 preparado en el Ejemplo 5.

15

Se calculó que el punto isoelectrico teórico de las regiones variables de F2H/L39 (secuencias de región variable de cadena pesada y región variable de cadena ligera) era de 4,3 usando GENETYX (GENETYX CORPORATION). Al mismo tiempo, el punto isoelectrico teórico de WT era de 9,20. Por lo tanto, WT se ha convertido mediante sustitución de aminoácidos en F2H/L39 que tiene una región variable con un punto isoelectrico teórico reducido en aproximadamente 4,9.

20

Ensayo de PK/PD de F2H/L39-IgG1 usando monos cinomolgus

25

El anticuerpo PM1 humanizado (tipo silvestre (WT)), anticuerpo PF1 y F2H/L39-IgG1 se evaluaron con respecto a su farmacocinética (PK) y farmacodinámica (PD) en monos cinomolgus. WT, PF1 y F2H/L39-IgG1 se administraron por vía subcutánea una vez a 1,0 mg/kg y se recogió sangre antes de la administración y a lo largo del ciclo temporal. La concentración de cada anticuerpo en plasma se determinó de la misma manera que se ha descrito en el Ejemplo 6. Los ciclos temporales de concentración en plasma de WT, PF1 y F2H/L39-IgG1 se muestran en la Figura 35. La eficacia de cada anticuerpo para neutralizar receptor de IL-6 de mono cinomolgus unido a membrana se evaluó. Se administró IL-6 de mono cinomolgus por vía subcutánea en la parte baja de la espalda a 5 µg/kg cada día desde el día 3 al día 10 después de la administración del anticuerpo y se determinó la concentración de CRP en cada animal 24 horas después. Los ciclos temporales de la concentración de CRP después de la administración de WT o F2H/L39 se muestran en la Figura 36. Para evaluar la eficacia de cada anticuerpo para neutralizar receptor de IL-6 de mono cinomolgus soluble, se determinó la concentración de receptor de IL-6 de mono cinomolgus soluble libre en el plasma de monos cinomolgus. Los ciclos temporales de concentración del receptor de IL-6 de mono cinomolgus soluble libre después de la administración de WT o F2H/L39 se muestran en la Figura 37.

30

35

40

Estos resultados mostraron que los ciclos temporales de concentración en plasma de WT y PF1 eran comparables entre sí; sin embargo, la concentración en plasma de F2H/L39-IgG1, que tiene un punto isoelectrico reducido, se mantuvo mayor que la de estos dos anticuerpos. Al mismo tiempo, en comparación con WT, se descubrió que F2H/L39-IgG1 que tiene una alta afinidad por receptor de IL-6 mantenía concentraciones menores de CRP y receptor de IL-6 de mono cinomolgus soluble libre.

45

[Ejemplo 14] Evaluación de la conservación en plasma de WT-M14

Método para estimar la conservación en plasma humano

50

Se sabe que la conservación prolongada (eliminación lenta) de molécula de IgG en plasma se debe a la función de FcRn que se conoce como un receptor de recuperación de molécula de IgG (Nat Rev. Immunol. sep 2007; 7(9): 715-25). Cuando se incorporan en endosomas mediante pinocitosis, en las condiciones ácidas dentro del endosoma (aproximadamente pH 6,0), las moléculas de IgG se unen con FcRn expresado en endosomas. Aunque las moléculas de IgG que no se unen con FcRn se transfieren y se degradan en lisosomas, las unidas a FcRn se translocan a la superficie celular y después se liberan de FcRn de vuelta al plasma de nuevo en las condiciones neutras en plasma (aproximadamente pH 7,4).

55

Los anticuerpos de tipo IgG conocidos incluyen los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Se ha indicado que las semividas en plasma de estos isotipos en seres humanos son de aproximadamente 36 días para IgG1 e IgG2; aproximadamente 29 días para IgG3; y 16 días para IgG4 (Nat. Biotechnol. dic 2007; 25(12): 1369-72). Por lo tanto,

60

se cree que la conservación de IgG1 e IgG2 en plasma es la más larga. En general, los isotipos de anticuerpos usados como agentes farmacéuticos son IgG1, IgG2 e IgG4. Los métodos presentados para prolongar adicionalmente la conservación de estos anticuerpos de IgG en plasma incluyen métodos para mejorar la actividad de unión anteriormente descrita para FcRn humano, y esto se consigue modificando la secuencia de región constante de IgG (J. Biol. Chem. 19 ene 2007; 282(3): 1709-1717; J. Immunol. 1 ene 2006; 176(1): 346-56).

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

Evaluación de la unión con FcRn humano

FcRn es un complejo de FcRn y β 2-microglobulina. Se prepararon cebadores de oligo-ADN basándose en la secuencia génica de FcRn humana desvelada (J. Exp. Med. (1994) 180 (6): 2377-2381). Se preparó un fragmento de ADN que codificaba el gen completo mediante PCR usando ADNc humano (ADNc de Placenta humana Marathon-Ready, Clontech) como un molde y los cebadores preparados. Usando el fragmento de ADN obtenido como un molde, se amplificó un fragmento de ADN que codificaba el dominio extracelular que contenía la región señal (Met1-Leu290) mediante PCR, y se insertó en un vector de expresión de células animales (la secuencia de aminoácidos de FcRn humano como se expone en SEQ ID NO: 140). De forma similar, se prepararon cebadores de oligo ADN basándose en la secuencia génica de β 2-microglobulina humana desvelada (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (2002) 99(26): 16899-16903). Se preparó un fragmento de ADN que codificaba el gen completo mediante PCR usando ADNc humano (ADNc de Placenta Humana Marathon-Ready, Clontech) como un molde y los cebadores preparados. Usando el fragmento de ADN obtenido como un molde, se amplificó un fragmento de ADN que codificaba la β 2-microglobulina completa que contenía una región señal (Met1-Met119) mediante PCR y se insertó en un vector de expresión de células animales (la secuencia de aminoácidos de β 2-microglobulina humana como se expone en SEQ ID NO: 141).

Se expresó FcRn humano soluble por el siguiente procedimiento. La plásmidos construidos para FcRn y β 2-microglobulina humanos se introdujeron en células de la línea celular derivada de cáncer de riñón embrionario humano HEK293H (Invitrogen) usando FBS 10 % (Invitrogen) mediante lipofección. El sobrenadante de cultivo resultante se recogió, y se purificó FcRn usando IgG Sepharose 6 Fast Flow (Amersham Biosciences) mediante el método descrito en J. Immunol. 1 nov 2002; 169(9): 5171-80, seguido de purificación adicional usando HiTrap Q HP (GE Healthcare).

La unión con FcRn humano se evaluó usando Biacore 3000. Se unió un anticuerpo con proteína L o anticuerpo anti cadena Kappa de IgG humano de conejo inmovilizado en una microplaca sensora, se añadió FcRn humano como un analito para interacción con el anticuerpo, y la afinidad (KD) se calculó a partir de la cantidad de FcRn humano unido. Específicamente, se inmovilizó anticuerpo anti cadena Kappa de IgG humana de conejo o proteína L en microplaca sensora CM5 (Biacore) mediante el método de acoplamiento de amina usando tampón de fosfato Na 50 mM (pH 6,0) que contenía NaCl 150 mM como el tampón de ejecución. Después, se diluyó un anticuerpo con un tampón de ejecución que contenía Tween 20 0,02 % y se inyectó para unirse con la microplaca. Después se inyectó FcRn humano y se evaluó la actividad de unión del FcRn humano para anticuerpo.

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

Evaluación para la conservación en plasma en ratones transgénicos para FcRn humano

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

Evaluación predictiva de la conservación en plasma de WT-M14 en seres humanos

Las actividades de WT-IgG1 y WT-M14 para unirse con FcRn humano se evaluaron mediante Biacore. Como se muestra en la Tabla 12, el resultado indicó que la actividad de unión de WT-M14 era ligeramente mayor que la de WT-IgG1

Tabla 12	
	KD(μ M)
WT-IgG1	2,07

	KD(μ M)
WT-M14	1,85

Como se muestra en la Figura 38, sin embargo, la conservación en plasma fue comparable entre WT-IgG1 y WT-M14 cuando se evaluó usando ratones transgénicos para FcRn humano. Este hallazgo sugiere que la conservación en plasma de la región constante de M14 en seres humanos es comparable a la de la región constante de IgG1.

[Ejemplo 15] Preparación de WT-M44, WT-M58 y WT-M73 que tienen conservación en plasma mejorada

Preparación de la molécula WT-M58

Como se describe en el Ejemplo 14, la conservación plasma de WT-M14 en ratones transgénicos para FcRn humano fue comparable a la de WT-IgG1. Los métodos conocidos para mejorar la conservación en plasma incluyen los que reducen el punto isoeléctrico de un anticuerpo y los que potencian la actividad de unión con FcRn. En el presente documento, las modificaciones descritas posteriormente se introdujeron para mejorar la conservación en plasma de WT-M14. Específicamente, las siguientes sustituciones se introdujeron en WT-M31 Δ GK, que se preparó a partir de WT-M14 como se describe en el Ejemplo 4: sustitución de valina por metionina en la posición 397; sustitución de histidina por glutamina en la posición 268; sustitución de arginina por glutamina en la posición 355; y sustitución de glutamina por ácido glutámico en la posición 419 en el sistema de numeración de EU. Estas cuatro sustituciones se introdujeron en WT-M31 Δ GK para generar WT-M58 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 142). Se prepararon vectores de expresión por el mismo método descrito en el Ejemplo 1. Se usaron WT-M58 y L(WT) como cadena pesada y cadena ligera, respectivamente. Se expresó WT-M58 y se purificó por el método descrito en el Ejemplo 1.

Construcción de la molécula de WT-M73

Por otro lado, se generó WT-M44 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 143) introduciendo en IgG1 una sustitución del aminoácido en la posición 434, numeración de EU, por alanina. WT-M83 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 185) también se generó por supresiones de glicina en la posición 446, numeración de EU y lisina en la posición 447, numeración de EU para reducir heterogeneidad C terminal de cadena pesada. Además, se generó WT-M73 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 144) introduciendo en WT-M58 una sustitución de alanina en la posición 434, numeración de EU.

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

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

Las actividades de unión de WT-IgG1, WT-M44, WT-M58 y WT-M73 con FcRn humano se evaluaron por Biacore. Como se muestra en la Tabla 13, el resultado indica que las actividades de unión de WT-M44, WT-M58 y WT-M73 son mayores que WT-IgG1 y aproximadamente 2,7, 1,4 y 3,8 veces la de WT-IgG1, respectivamente.

Tabla 13	
	KD(μ M)
WT-IgG1	1,62
WT-M44	0,59
WT-M58	1,17
WT-M73	0,42

Como resultado de la evaluación de WT-IgG1, WT-M14 y WT-M58 con respecto a su conservación en plasma en ratones transgénicos para FcRn humano, como se muestra en la Figura 39, se confirmó que WT-M58 tenía conservación en plasma aumentada en relación con WT-IgG1 y WT-M14. Además, WT-IgG1, WT-M44, M58-WT y WT-M73 se evaluaron con respecto a su conservación en plasma en ratones transgénicos para FcRn humano. Como se muestra en la Figura 40, se confirmó que todos los de WT-M44, M58-WT y WT-M73 tenían conservación en plasma mejorada en relación con WT-IgG1. El efecto de mejora de la conservación en plasma se correlacionó con la actividad de unión con FcRn humano. En particular, el nivel en plasma de WT-M73 el día 28 se mejoró hasta aproximadamente 16 veces el de WT-IgG1. Este hallazgo sugiere que la conservación en plasma de anticuerpos con la región constante de M73 en ser humano también aumenta significativamente en comparación con anticuerpos con la región constante de IgG1.

[Ejemplo 16] Efecto de las regiones constantes nuevas M14 y M58 en la reducción de la heterogeneidad en diversos anticuerpos

Como se describe en el Ejemplo 8, se ha demostrado que la heterogeneidad originada de la región bisagra de IgG2

podría reducirse convirtiendo la región constante de IgG2 a M14 en el anticuerpo PM1 anti receptor de IL-6 humanizado (WT). También se ensayaron anticuerpos de tipo IgG2 distintos del anticuerpo PM1 humanizado para evaluar si la heterogeneidad puede reducirse convirtiendo sus regiones constantes en M14 o M58.

Fueron anticuerpo distintos del anticuerpo PM1 humanizado: el anticuerpo anti receptor de IL-6 F2H/L39 (las secuencias de aminoácidos de región variable de cadena ligera F2H/L39_VH y F2H/L39 como se expone en SEQ ID NO: 145 y 146, respectivamente); anticuerpo anti receptor de IL-31 H0L0 (las secuencias de aminoácidos de H0L0_VH y H0L0_VL como se expone en SEQ ID NO: 147 y 148, respectivamente); y anticuerpo anti RANKL DNS (las secuencias de aminoácidos de DNS_VH y DNS_VL como se expone en SEQ ID NO: 149 y 150, respectivamente). Para cada uno de estos anticuerpos, se generaron anticuerpos con región constante de IgG1 (SEQ ID NO: 19), región constante de IgG2 (SEQ ID NO: 20) o M14 (SEQ ID NO: 24) o M58 (SEQ ID NO: 151).

Los anticuerpos generados se evaluaron con respecto a heterogeneidad mediante cromatografía de intercambio catiónico usando un gradiente adecuado y un caudal apropiado en una columna ProPac WCX-100 (Dionex) (fase móvil A: acetato sódico 20 mM (pH 5,0), fase móvil B: acetato sódico 20 mM/NaCl 1 M (pH 5,0)). El resultado de la evaluación obtenido por cromatografía de intercambio catiónico (IEC) se muestra en la Figura 41.

Como se muestra en la Figura 41, se demostró que la conversión de la región constante de un tipo IgG1 a un tipo IgG2 aumentaba la heterogeneidad no solamente en el anticuerpo PM1 anti receptor de IL-6 humanizado (WT), sino también en el anticuerpo anti receptor de IL-6 F2H/L39, anticuerpo anti receptor de IL-31 H0L0 y anticuerpo anti RANKL DNS. Por el contrario, la heterogeneidad pudo reducirse en todos estos anticuerpos convirtiendo su región constante en M14 o M58. Por lo tanto, se demostró que, independientemente del tipo de antígeno o secuencia de región variable de anticuerpo, la heterogeneidad originada de IgG2 natural podría reducirse sustituyendo cisteínas por serinas en la posición 131, numeración de EU, en el dominio CH1 de cadena pesada y en la posición 219, numeración de EU, en la bisagra superior de cadena pesada.

[Ejemplo 17] Efecto de la región constante nueva M58 para mejorar la conservación en plasma en diversos anticuerpos

Como se describe en el Ejemplo 15, se ha demostrado que la conversión de la región constante de IgG1 a M58 en el anticuerpo PM1 anti receptor de IL-6 humanizado (WT) mejoró la actividad de unión con FcRn humano y conservación en plasma en ratones transgénicos para FcRn humano. Por lo tanto, también se ensayaron anticuerpos tipo IgG1 distintos del anticuerpo PM1 humanizado para evaluar si su conservación en plasma puede mejorarse convirtiendo su región constante en M58.

Fueron anticuerpos distintos del anticuerpo PM 1 humanizado (WT) el anticuerpo anti receptor de IL-31 H0L0 (las secuencias de aminoácidos de H0L0_VH y H0L0_VL como se expone en SEQ ID NO: 147 y 148, respectivamente) y anticuerpo anti RANKL DNS (las secuencias de aminoácidos de DNS_VH y DNS_VL como se expone en SEQ ID NO: 149 y 150, respectivamente). Para cada uno de estos anticuerpos, se generaron anticuerpos con región constante de IgG1 (SEQ ID NO: 19) o M58 (SEQ ID NO 151), y se evaluaron con respecto a su actividad de unión con FcRn humano por el método descrito en el Ejemplo 14. El resultado se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14			
	KD (μM)		
	WT	H0L0	DNS
IgG1	1,42	1,07	1,36
M58	1,03	0,91	1,03

Como se muestra en la Tabla 14, se demostró que, como resultado de la conversión de la región constante del tipo IgG1 a M58, como el anticuerpo anti receptor de IL-6 WT, las actividades de unión tanto del anticuerpo anti receptor de IL-31 H0L0 como del anticuerpo anti RANKL DNS con FcRn humano se mejoraron. Esto sugiere la posibilidad de que independientemente del tipo de antígeno o secuencia de región variable de anticuerpo, la conservación en plasma en seres humanos se mejora convirtiendo la región constante del tipo IgG1 a M58.

[Ejemplo 18] Efecto de la cisteína en el dominio CH1 en la heterogeneidad y estabilidad

Como se ha descrito en el Ejemplo 8, se sustituyeron cisteínas en la región bisagra y dominio CH1 de IgG2 para reducir la heterogeneidad de IgG2 natural. La evaluación de diversos anticuerpos modificados reveló que la heterogeneidad podría reducirse sin reducir la estabilidad usando SKSC (SEQ ID NO: 154). SKSC (SEQ ID NO: 154) es una región constante modificada obtenida sustituyendo cisteína por serina en la posición 131 y arginina por lisina en la posición 133, numeración de EU, en el dominio CH1 de cadena pesada, y cisteína por serina en la posición 219, numeración de EU, en la bisagra superior de cadena pesada de la secuencia de región constante de IgG2 de tipo silvestre.

Al mismo tiempo, otro posible método para reducir la heterogeneidad es una única sustitución de cisteína por serina en la posición 219, o cisteína por serina en la posición 220, numeración de EU, en la bisagra superior de cadena pesada. La región constante de IgG2 modificada SC (SEQ ID NO: 155) se preparó sustituyendo cisteína por serina en la posición 219 y CS (SEQ ID NO: 156) se preparó sustituyendo cisteína por serina en la posición 220, numeración de EU, en IgG2. WT-SC (SEQ ID NO: 157) y WT-CS (SEQ ID NO: 158) se prepararon para tener SC y CS, respectivamente, y se compararon con WT-IgG1, IgG2 WT, WT-SKSC y WT-M58 con respecto a heterogeneidad y estabilidad térmica. Además, F2H/L39-IgG1, F2H/L39-IgG2, F2H/L39-SC, F2H/L39-CS, F2H/L39-SKSC y F2H/L39-M14, que tienen la región constante de IgG1 (SEQ ID NO: 19), IgG2 (SEQ ID NO: 20), SC (SEQ ID NO: 155), CS (SEQ ID NO: 156), SKSC (SEQ ID NO: 154) o M14 (SEQ ID NO: 24), respectivamente, se prepararon a partir de F2H/L39 (las secuencias de aminoácidos de F2H/L39_VH y F2H/L39_VL como se expone en SEQ ID NO: 145 y 146, respectivamente), que es un anticuerpo anti receptor de IL-6 diferente de WT. Los anticuerpos se compararon con respecto a heterogeneidad y estabilidad.

WT-IgG1, WT-IgG2, WT-SC, WT-CS, WT-SKSC, WT-M58, F2H/L39-IgG1, F2H/L39-IgG2, F2H/L39-SC, F2H/L39-CS, F2H/L39-SKSC y F2H/L39-M14 se evaluaron con respecto a heterogeneidad mediante cromatografía de intercambio catiónico usando un gradiente adecuado y un caudal apropiado en una columna ProPac WCX-10 (Dionex) (fase móvil A: acetato sódico 20 mM (pH 5,0), fase móvil B: acetato sódico 20 mM/NaCl 1 M (pH 5,0)). El resultado de la evaluación obtenido por cromatografía de intercambio catiónico se muestra en la Figura 42.

Como se muestra en Figura 42, se demostró que la conversión de la región constante de un tipo IgG1 a un tipo IgG2 aumentaba la heterogeneidad tanto en WT como en F2H/L39. Por el contrario, la heterogeneidad se redujo significativamente convirtiendo la región constante en SKSC y M14 o M58. Al mismo tiempo, la conversión de la región constante en SC redujo significativamente la heterogeneidad, como en el caso de SKSC. Sin embargo, la conversión a CS no mejoró suficientemente la heterogeneidad.

Además de baja heterogeneidad, se desea en general alta estabilidad cuando se preparan formulaciones estables en el desarrollo de productos farmacéuticos de anticuerpo. Por lo tanto, para evaluar la estabilidad, la temperatura de punto medio de desnaturalización térmica (valor T_m) se determinó mediante DSC (VP-DSC; Microcal). La temperatura de punto medio de desnaturalización térmica (valor T_m) actúa como un indicador de estabilidad. Para preparar formulaciones estables como agentes farmacéuticos, se prefiere una temperatura de punto medio mayor de desnaturalización térmica (valor T_m) (J. Pharm. Sci. abr 2008; 97 (4): 1414-1426). WT-IgG1, WT-IgG2, WT-SC, WT-CS, WT-SKSC y WT-M58 se dializaron (EasySEP; TOMY) frente a una solución de acetato sódico 20 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0. Se llevó a cabo medición de DSC a una velocidad de calentamiento de 1 °C/min en un intervalo de 40 °C a 100 °C, y a una concentración de proteínas de aproximadamente 0,1 mg/ml. Las curvas de desnaturalización obtenidas por DSC se muestran en la Figura 43. Los valores de T_m de los dominios Fab se enumeran en la Tabla 15 a continuación.

Tabla 15

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

Los valores de T_m de WT-IgG1 y WT-IgG2 fueron casi iguales (aproximadamente 94 °C; T_m de IgG2 fue aproximadamente 1 °C menor). Al mismo tiempo, los valores de T_m de WT-SC y WT-CS fueron de aproximadamente 86 °C, y por lo tanto significativamente menores que los de WT-IgG1 y WT-IgG2. Por otro lado, los valores de T_m de WT-M58 y WT-SKSC fueron de aproximadamente 94 °C, y comparables a los de WT-IgG1 y WT-IgG2. Esto sugiere que WT-SC y WT-CS son notablemente inestables en comparación con IgG2, y por lo tanto, WT-SKSC y WT-M58, ambos de los cuales también comprenden sustitución de cisteína por serina en el dominio CH1, se prefieren en el desarrollo de productos farmacéuticos de anticuerpo. Se cree que la razón de la reducción significativa de T_m en WT-SC y WT-CS en relación con IgG2 son diferencias en el patrón de enlaces disulfuro entre WT-SC o WT-CS e IgG2.

Además, la comparación de curvas de desnaturalización de DSC mostró que WT-IgG1, WT-SKSC y WT-M58 proporcionaban cada uno un pico de desnaturalización individual y pronunciado para el dominio Fab. Por el contrario, WT-SC y WT-CS proporcionaron cada uno un pico de desnaturalización más amplio para el dominio Fab. WT-IgG2 también proporcionó un pico de hombro en el lado de temperatura menor del pico de desnaturalización de dominio Fab. En general, se considera que un único componente proporciona un pico de desnaturalización de DSC pronunciado, y cuando dos o más componentes con diferentes valores T_m (concretamente, heterogeneidad) están presentes, el pico de desnaturalización se hace más amplio. Específicamente, el resultado anteriormente descrito

sugiere la posibilidad de que cada uno de WT-IgG2, WT-SC y WT-CS contenga dos o más componentes, y por lo tanto la heterogeneidad de IgG2 natural no se ha reducido lo suficiente en WT-SC y WT-CS. Este hallazgo sugiere que no solamente las cisteínas en la región bisagra sino también las del dominio CH1 están implicadas en la heterogeneidad de IgG2 de tipo silvestre, y es necesario modificar no solamente cisteínas en la región bisagra sino también las del dominio CH1 para reducir la heterogeneidad de DSC. Además, como se ha descrito anteriormente, puede conseguirse estabilidad comparable a la de IgG2 de tipo silvestre solamente cuando se sustituyen cisteínas tanto en la región bisagra como en el dominio CH1.

El hallazgo anterior sugiere que desde la perspectiva de la heterogeneidad y estabilidad, SC y CS, que son regiones constantes introducidas con sustitución de serina solamente para la cisteína de región bisagra, son insuficientes como regiones constantes para reducir la heterogeneidad originada de la región bisagra de IgG2. Se descubrió por lo tanto que la heterogeneidad podría reducirse significativamente manteniendo al mismo tiempo una estabilidad equivalente a IgG2, solamente cuando la cisteína en la posición 131, numeración de EU, en el dominio CH1 se sustituyó con serina, además de cisteína en la región bisagra. Dichas regiones constantes incluyen M14, M31, M58 y M73 descritas anteriormente. En particular, M58 y M73 son estables y menos heterogéneas, y muestran conservación mejorada en plasma, y por lo tanto se espera que sean muy útiles como regiones constantes para productos farmacéuticos de anticuerpo.

[Ejemplo 19] Generación de anticuerpos anti receptor de IL-6 completamente humanizados con PK/PD mejoradas

Para generar un anticuerpo anti receptor de IL-6 completamente humanizado con PK/PD mejoradas, las moléculas descritas posteriormente se crearon modificando TOCILIZUMAB (cadena pesada, WT-IgG1 (SEQ ID NO: 15); cadena ligera, WT (SEQ ID NO: 105).

Para mejorar la k_a de F2H-IgG1, se llevaron a cabo sustituciones de triptófano por valina en la posición 35, tirosina por fenilalanina en la posición 50 y serina por treonina en la posición 62, que son la sustitución potenciadora de afinidad obtenida en el Ejemplo 2. Además, para reducir el punto isoeléctrico sin aumentar el riesgo de inmunogenicidad, se llevaron a cabo sustituciones de tirosina por valina en la posición 102, glutamina por ácido glutámico en la posición 105 e isoleucina por treonina en la posición 107, y se llevó a cabo conversión de la región constante de un tipo IgG1 a un tipo M83 y se generó VH5-M83 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 139). Además, para mejorar la k_a de L39, se preparó VL5-kappa (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 181) y comprende una sustitución de ácido glutámico por glutamina en la posición 27. Además, se prepararon variantes de TOCILIZUMAB combinando dos o más de las mutaciones en regiones variables y constantes descritas en los ejemplos anteriores y mutaciones recién descubiertas. Se descubrieron los siguientes anticuerpos anti receptor de IL-6 completamente humanizados usando diversos ensayos de exploración: Fv3-M73 (cadena pesada, VH4-M73, SEQ ID NO: 182; cadena ligera, VL1-kappa, SEQ ID NO: 183), Fv4-M73 (cadena pesada, VH3-M73, SEQ ID NO: 180; cadena ligera, VL3-kappa, SEQ ID NO: 181) y Fv5-M83 (cadena pesada, VH5-M83, SEQ ID NO: 139; cadena ligera, VL5-kappa, SEQ ID NO: 138).

Las afinidades de Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 preparados contra el receptor de IL-6 se compararon con la de TOCILIZUMAB. Las afinidades de estos anticuerpos anti receptor de IL-6 determinadas se muestran en la Tabla 16. Además, sus actividades neutralizantes de BaF/gp130 se compararon con las de TOCILIZUMAB y el control (el anticuerpo anti receptor de IL-6 de alta afinidad conocido descrito en el Ejemplo de Referencia y VQ8F11-21 hIgG1 descrito en el documento US 2007/0280945). Los resultados obtenidos determinando las actividades biológicas de estos anticuerpos usando BaF/gp130 se muestran en la Figura 44 (TOCILIZUMAB, el control y Fv5-M83 con una concentración de IL-6 final de 300 ng/ml) y Figura 45 (TOCILIZUMAB, Fv3-M73 y Fv4-M73 con una concentración de IL-6 final de 30 ng/ml). Como se muestra en la Tabla 16, Fv3-M73 y Fv4-M73 tienen una afinidad de aproximadamente dos a tres veces mayor que el TOCILIZUMAB, mientras que Fv5-M83 muestra aproximadamente 100 veces más afinidad que TOCILIZUMAB (ya que fue difícil medir la afinidad de Fv5-M83, en lugar de determinarse la afinidad usando Fv5-IgG1, que tiene una región constante de tipo IgG1; se cree en general que la región constante no tiene ningún efecto en la afinidad). Como se muestra en la Figura 45, Fv3-M73 y Fv4-M73 muestran actividades ligeramente más fuertes que TOCILIZUMAB. Como se muestra en la Figura 44, Fv5-M83 tiene una actividad muy fuerte, que es más de 100 veces mayor que la de TOCILIZUMAB con respecto a concentración inhibidora al 50 %. Fv5-M83 también muestra una actividad neutralizante aproximadamente diez veces mayor con respecto a concentración inhibitoria al 50 % que el control (el anticuerpo anti receptor de IL-6 de alta afinidad conocido).

Tabla 16

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

Los puntos isoeléctricos de TOCILIZUMAB, el control, Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 se determinaron mediante isoelectroenfoque usando un método conocido por los expertos en la materia. El resultado mostró que el punto isoeléctrico fue de aproximadamente 9,3 para TOCILIZUMAB; aproximadamente 8,4 a 8,5 para el control; aproximadamente 5,7 a 5,8 para Fv3-M73; aproximadamente 5,6 a 5,7 para Fv4-M73; y 5,4 a 5,5 para Fv5-M83. Por lo tanto, cada anticuerpo tuvo un punto isoeléctrico significativamente reducido en comparación con TOCILIZUMAB y el control. Además, el punto isoeléctrico teórico de las regiones variables VH/VL se calculó mediante GENETYX (GENETYX CORPORATION). El resultado mostró que el punto isoeléctrico teórico fue de 9,20 para TOCILIZUMAB; 7,79 para el control; 5,49 para Fv3-M73; 5,01 para Fv4-M73; y 4,27 para Fv5-M83. Por lo tanto, cada anticuerpo tuvo un punto isoeléctrico significativamente reducido en comparación con TOCILIZUMAB y el control. En consecuencia, se creyó que la conservación en plasma de Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 mejoraba en comparación con TOCILIZUMAB y el control.

Se analizaron epítomos de linfocitos T en la secuencia de región variable de TOCILIZUMAB, Fv3-M73, Fv4-M73 o Fv5-M83 usando TEPITOPE (dic 2004; 34 (4): 468-75). Como resultado, se ha predicho que TOCILIZUMAB tiene epítomos de linfocitos T, de los que muchos podrían unirse con HLA. Por el contrario, el número de secuencias que se predijo que se unirían con epítomos de linfocitos T se redujo significativamente en Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83. Además, el marco conservado de Fv3-M73, Fv4-M73 o Fv5-M83 no tiene ninguna secuencia de ratón y está por lo tanto completamente humanizado. Esto sugiere la posibilidad de que el riesgo de inmunogenicidad se reduzca significativamente en Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 en comparación con TOCILIZUMAB.

[Ejemplo 20] Ensayo de PK/PD de anticuerpos anti receptor de IL-6 completamente humanizados en monos

Cada uno de TOCILIZUMAB, el control, Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 se administró por vía intravenosa una vez a una dosis de 1 mg/kg a monos cinomolgus para evaluar los ciclos temporales de sus concentraciones en plasma (véase Ejemplo de Referencia para el método). Los ciclos temporales de concentración en plasma de TOCILIZUMAB, Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 después de la administración intravenosa se muestran en la Figura 46. El resultado mostró que cada uno de Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 mostraba conservación en plasma significativamente mejorada en monos cinomolgus en comparación con TOCILIZUMAB y el control. De ellos, Fv3-M73 y Fv4-M73 mostraba conservación en plasma sustancialmente mejorada en comparación con TOCILIZUMAB.

Se evaluó la eficacia de cada anticuerpo para neutralizar el receptor de IL-6 de mono cinomolgus unido a membrana. Se administró IL-6 de mono cinomolgus por vía subcutánea en la zona lumbar a 5 µg/kg cada día desde el Día 6 al Día 18 después de la administración de anticuerpo (Día 3 a Día 10 para TOCILIZUMAB), y la concentración de CRP en cada animal se determinó 24 horas después (véase ejemplo de referencia para el método). El ciclo temporal de concentración de CRP después de la administración de cada anticuerpo se muestra en la Figura 47. Para evaluar la eficacia de cada anticuerpo para neutralizar receptor de IL-6 de mono cinomolgus soluble, la concentración en plasma de receptor de IL-6 de mono cinomolgus soluble libre en los monos cinomolgus se determinó y se calculó el porcentaje de neutralización del receptor de IL-6 soluble (véase Ejemplo de Referencia para el método). El ciclo temporal de porcentaje de neutralización de receptor de IL-6 soluble después de la administración de cada anticuerpo se muestra en la Figura 48.

Cada uno de Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 neutralizó el receptor de IL-6 de mono cinomolgus unido a membrana de una manera más sostenible, y suprimió el aumento de CRP a lo largo de un periodo más largo en comparación con TOCILIZUMAB y el control (el anticuerpo anti receptor de IL-6 de alta afinidad conocido). Además, cada uno de Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 neutralizó el receptor de IL-6 de mono cinomolgus soluble de una manera más sostenible y suprimió el aumento de receptor de IL-6 de mono cinomolgus soluble libre durante un periodo más largo en comparación con TOCILIZUMAB y el control. Estos hallazgos demuestran que todos de Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 son superiores en el mantenimiento de la neutralización de receptores de IL-6 unidos a membrana y solubles que TOCILIZUMAB y el control. De ellos, Fv3-M73 y Fv4-M73 son notablemente superiores en el mantenimiento de la neutralización. Al mismo tiempo, Fv5-M83 suprimió CRP y receptor de IL-6 de mono cinomolgus soluble libre más fuertemente que Fv3-M73 y Fv4-M73. Por lo tanto, se considera que Fv5-M83 es más fuerte que Fv3-M73, Fv4-M73 y el control (el anticuerpo anti receptor de IL-6 de alta afinidad conocido) en la neutralización de receptores de IL-6 solubles y unidos a membrana. Se consideró que los resultados *in vivo* de monos cinomolgus reflejan la afinidad más fuerte de Fv5-M83 por el receptor de IL-6 y la actividad biológica más fuerte de Fv5-M83 en el sistema de ensayo de BaF/gp130 en relación con el control.

Estos hallazgos sugieren que Fv3-M73 y Fv4-M73 son altamente superiores en el mantenimiento de sus actividades como un anticuerpo neutralizante anti receptor de IL-6 en comparación con TOCILIZUMAB y el control, y por lo tanto permiten reducir significativamente la dosificación y frecuencia de administración. Además, se demostró que Fv5-M83 era notablemente superior con respecto a fuerza de actividad como un anticuerpo neutralizante anti receptor de IL-6 así como mantenimiento de su actividad. Por lo tanto, se esperaba que Fv3-M73, Fv4-M73 y Fv5-M83 fueran útiles como antagonistas de IL-6 farmacéuticos.

[Ejemplo de referencia]

Preparación de receptor de IL-6 de mono cinomolgus recombinante soluble (CIL-6R)

Se prepararon cebadores de Oligo ADN basándose en la secuencia génica desvelada para receptor de IL-6 de mono Rhesus (Birney *et al.*, Ensembl 2006, Nucleic Acids Res. 1 ene 2006; 34 (número de Base de datos): D556-61). Se preparó un fragmento de ADN que codificaba el gen del receptor de IL-6 de mono cinomolgus completo mediante PCR usando los cebadores, y como un molde, ADNc preparado del páncreas de mono cinomolgus. El fragmento de ADN resultante se insertó en un vector de expresión de células animales, y se preparó una línea CHO de expresión estable (línea celular CHO productora de cyno.sIL-6R) usando el vector. El medio de cultivo de células CHO productoras de cyno.sIL-6R se purificó usando una columna de HisTrap (GE Healthcare Bioscience) y después se concentró con Amicon Ultra-15 Ultracel-1 Ok (Millipore). Se obtuvo una muestra purificada final de receptor de IL-6 de mono cinomolgus soluble (en lo sucesivo en el presente documento "CIL-6R") mediante purificación adicional en una columna de filtración en gel Superdex200pg16/60 (GE Healthcare Bioscience).

Preparación de IL-6 de mono cinomolgus recombinante (CIL-6)

Se preparó IL-6 de mono cinomolgus por el procedimiento descrito a continuación. La secuencia de nucleótidos que codifica 212 aminoácidos depositados con el n.º de referencia de SwissProt P79341 se preparó y se clonó en un vector de expresión de células animales. El vector resultante se introdujo en células CHO para preparar una línea celular de expresión estable (línea celular CHO productora de cyno.IL-6). El medio de cultivo de células CHO productoras de cyno.IL-6 se purificó usando una columna de SP-Sepharose/FF (GE Healthcare Bioscience) y después se concentró con Amicon Ultra-15 Ultracel-5k (Millipore). Se obtuvo una muestra purificada final de IL-6 de mono cinomolgus (en lo sucesivo en el presente documento "cIL-6") mediante purificación adicional en una columna de filtración en gel Superdex75pg26/60 (GE Healthcare Bioscience), seguido de concentración con Amicon Ultra-15 Ultracel-5k (Millipore).

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

Se construyó un vector de expresión de células animales para expresar VQ8F11-21 hlgG1, un anticuerpo anti receptor de IL-6 de alta afinidad conocido. Se describe VQ8F11-21 hlgG1 en el documento US 2007/0280945 A1 (documento US 2007/0280945 A1; las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y cadena ligera como se expone en SEQ ID NO: 19 y 27, respectivamente). La región variable de anticuerpo se construyó mediante PCR usando una combinación de oligo ADN sintéticos (PCR de ensamblaje). Se usó IgG1 como la región constante. Las regiones variables y constantes de anticuerpo se combinaron entre sí mediante PCR de ensamblaje, y después se insertaron en un vector de expresión de células animales para construir vectores de expresión para la cadena pesada y cadena ligera de interés. Las secuencias de nucleótidos de los vectores de expresión resultantes se determinaron mediante un método conocido por los expertos en la materia. El anticuerpo anti receptor de IL-6 de alta afinidad (abreviado en lo sucesivo en el presente documento como "control") se expresó y se purificó usando los vectores de expresión construidos mediante el método descrito en el Ejemplo 1.

Análisis basado en Biacore de unión con receptor de IL-6

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

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

Las concentraciones en plasma en monos cinomolgus se determinaron por ELISA usando un método conocido por los expertos en la materia. La concentración de CRP se determinó con un analizador automático (TBA-120FR; Toshiba Medical Systems Co.) usando Cias R CRP (KANTO CHEMICAL CO., INC.).

La concentración en plasma de receptor de IL-6 de mono cinomolgus soluble libre en monos cinomolgus se determinó por el procedimiento descrito posteriormente. Todos los anticuerpos IgG (IgG de mono cinomolgus, anticuerpo anti receptor de IL-6 humano y complejo de anticuerpo anti receptor de IL-6 humano-receptor de IL-6 de mono cinomolgus soluble) en plasma se adsorbieron en Proteína A cargando 30 μ l del plasma de mono cinomolgus en una cantidad apropiada de resina de rProteína A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) secada en una copa de filtro de 0,22 μ m (Millipore). Después, la solución en la copa se centrifugó usando una centrífuga de alta velocidad para recoger la solución que atravesaba. La solución que atravesaba no contenía complejo de anticuerpo anti receptor de IL-6 humano unido a Proteína A-receptor de IL-6 de mono cinomolgus soluble. Por lo tanto, la concentración de receptor de IL-6 soluble libre puede determinarse midiendo la concentración de receptor de IL-6 de mono cinomolgus soluble en la solución que atravesaba la Proteína A. La concentración de receptor de IL-6 de

mono cinomolgus soluble se determinó usando un método conocido por los expertos en la materia para medir las concentraciones de receptor de IL-6 humano soluble. Se usó como patrón receptor de IL-6 de mono cinomolgus soluble (CIL-6R) preparado como se ha descrito anteriormente.

5 Después se calculó el porcentaje de neutralización del receptor de IL-6 soluble por la siguiente fórmula.

$$\frac{[(\text{Concentración de receptor de IL-6 soluble libre después de la administración de anticuerpo})/(\text{concentración de receptor de IL-6 soluble antes de la administración de anticuerpo})] \times 100}{}$$

10 [Ejemplo 21]

(1) Preparación de genes con mutaciones puntuales de anticuerpo humanizado H0L0

15 Se construyeron diversos genes mutantes puntuales como un material de partida codificando el gen un anticuerpo de glipicano 3 que comprende la CDR de anticuerpo humanizado GC33 desvelado en el documento WO2006/046751. Se diseñaron oligo ADN y se sintetizaron basándose en secuencias directas e inversas que contenían un sitio de mutación. Se prepararon varios genes mutantes puntuales usando Kit de Mutagénesis Dirigida QuikChange (Stratagene) disponible en el mercado. Los genes que comprendían mutaciones puntuales se prepararon mediante PCR en las condiciones posteriores. Una mezcla de reacción que consistía en 10 ng de plásmido molde, 10 pmoles de cada uno de oligo ADN sintéticos directos e inversos, Tampón 10x adjunto al kit, mezcla de dNTP y ADN polimerasa Pfu turbo se trataron calentando a 95 °C durante 30 segundos, seguido de PCR de 18 ciclos que consistían en: 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante un minuto y 68 °C durante cuatro minutos. *DpnI* incluido en el kit se añadió a la mezcla de reacción, seguido de una hora de digestión con enzimas de restricción a 37 °C. Como resultado de la transformación de células competentes DH5α (TOYOBO) con la mezcla de reacción, se obtuvieron transformantes. Se aislaron ADN plasmídicos de los transformantes y después se secuenciaron. Los genes mutantes puntuales, que se confirmó que tenían mutaciones puntuales introducidas basándose en las secuencias de nucleótidos determinadas de los ADN plasmídicos, se clonaron en vectores de expresión que permitían la expresión de genes insertados en células animales. Los genes modificados se obtuvieron por modificaciones descritas posteriormente.

30 Se expresaron transitoriamente anticuerpo humanizado H0L0 y sus mutantes puntuales usando polietilenimina (Polysciences Inc.). Se desprendieron células HEK293 usando tripsina EDTA (Invitrogen) y se sembraron en placas a 6×10^6 células/10 ml en placas de cultivo de 10 cm². Al día siguiente, se combinaron 4,6 µg y 9,2 µg de los ADN plasmídicos de expresión de cadena pesada y cadena ligera, respectivamente, con 690 µl de medio SFMII y 20,8 µg de polietilenimina. Después de mezclar los materiales combinados, la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante diez minutos. La mezcla completa se añadió por gotas a cada una de las placas de cultivo donde se habían sembrado células HEK293 como se ha descrito anteriormente, y el sobrenadante de cultivo se recogió después de aproximadamente 72 horas. El anticuerpo humanizado expresado H0L0 y sus mutantes puntuales se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo usando rProteinaA Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare) de acuerdo con el protocolo adjunto.

(1-1) Modificación del valor de Tm de anticuerpo humanizado H0L0

45 La temperatura de punto medio de desnaturalización térmica (Tm) se define como el máximo de pico de pico de desnaturalización en termogramas (Cp frente a T) obtenido como resultado de calentar una solución de muestras de ensayo a una velocidad de calentamiento programada constante. Para determinar el valor de Tm del anticuerpo humanizado H0L0, se preparó una solución de muestra para ensayo de DSC por el siguiente procedimiento. En primer lugar, se colocó una solución que contenía de 50 a 100 µg de un anticuerpo en una membrana de diálisis y se dializó durante un día y una noche completos frente a tampón de acetato sódico 20 mol/l (pH 6,0) que contenían cloruro sódico 150 mmol/l como el dializado externo. Después, se preparó una solución de muestra ajustando la concentración de anticuerpo a 50 a 100 µg/ml usando el dializado externo, y se usó como una solución de muestra de ensayo para ensayo de DSC.

55 Un dispositivo de DSC apropiado, por ejemplo, DSC-II (Calorimetry Sciences Corporation) se usa preferentemente en este experimento. Después de desaireación exhaustiva, la solución de muestra preparada por el método descrito anteriormente y la solución de referencia (dializado externo) se incluyeron en celdas calorimétricas, y se equilibraron térmicamente exhaustivamente a 40 °C. Después, las soluciones se exploraron de 40 °C a 100 °C con una velocidad de exploración de aproximadamente 1 K/min. El resultado de ensayo se presentó como el máximo de pico de desnaturalización que está en función de la temperatura. Los picos del dominio Fab se asignaron para determinar la temperatura de punto medio de desnaturalización térmica para anticuerpo humanizado H0L0, basándose en un documento no de patente (Rodolfo *et al.*, Immunology Letters (1999) 47-52). Como un ejemplo específico, se muestra un diagrama de DSC obtenido para el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2) en la Figura 49.

65 De acuerdo con el cálculo por el método descrito anteriormente, el valor de Tm del anticuerpo humanizado H0L0 que comprende la cadena pesada de SEQ ID NO: 195 y la cadena ligera de SEQ ID NO: 201 fue de 76,6 °C. Como ejemplos de anticuerpos conocidos, se calculó que los valores de Tm de Synagis y Herceptina eran de 85,4 °C y

81,8 °C, respectivamente. Esto sugiere que el valor de T_m del anticuerpo humanizado H0L0 es menor que los de los anticuerpos conocidos.

Para aumentar el valor de T_m del anticuerpo humanizado H0L0, se preparó un anticuerpo modificado. Se preparó H15 (SEQ ID NO: 196) modificando FR2 de la cadena pesada de anticuerpo H0L0 (SEQ ID NO: 195) con modificaciones V37I, A40P, M48I y L51I que convirtieron la subclase de VH1b a VH4. El valor de T_m se mejoró hasta 79,1 °C. Se preparó L4 (SEQ ID NO: 202) modificando FR2 de la cadena ligera de anticuerpo H0L0 (SEQ ID NO: 201) con modificaciones L42Q, S48A y Q50R que convirtieron la subclase de VK2 a VK3, y sustituyendo V2 de FR1 con una secuencia de línea germinal, I (modificación V2I). El valor de T_m se mejoró hasta 77,2 °C. Se preparó el anticuerpo H15L4 combinando estos dos anticuerpos modificados y, como resultado, el valor de T_m se mejoró hasta 80,5 °C.

(1-2) Modificación del valor del punto isoelectrónico del anticuerpo humanizado H0L0

La semivida en sangre de un anticuerpo se prolonga a medida que se reduce el valor del punto isoelectrónico del anticuerpo. Por el contrario, un aumento en el valor del punto isoelectrónico del anticuerpo mejora la transferencia del anticuerpo a tejidos. Aún se desconoce si el efecto supresor de tumores de anticuerpos que son eficaces en la terapia de cáncer se potencia por un aumento o una reducción en el valor de punto isoelectrónico del anticuerpo. Por lo tanto, se prepararon anticuerpos modificados a partir del anticuerpo humanizado H0L0, uno de los cuales tuvo un punto isoelectrónico reducido y el otro tuvo un punto isoelectrónico aumentado. El efecto supresor de tumores se comparó entre los dos anticuerpos para ensayar qué modificación da como resultado un efecto supresor de tumores más fuerte.

El valor del punto isoelectrónico de cada anticuerpo se calculó basándose en el análisis de isoelectroenfoque de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se hinchó gel IEF seco Phast-Gel (Amersham Bioscience) durante aproximadamente 60 minutos en Casete del sistema Phast (Amersham Bioscience) usando una solución de hinchamiento con una de las siguientes composiciones.

(a) Composición de solución de hinchamiento de punto isoelectrónico alto:

1,5 ml de glicerol 10 %
100 µl de Pharmalyte 8-10,5 para IEF (Amersham Bioscience)

(b) Composición de solución de hinchamiento de punto isoelectrónico bajo:

1,5 ml de agua purificada
20 µl de Pharmalyte 8-10,5 para IEF (Amersham Bioscience)
80 µl de Pharmalyte 5-8 para IEF (Amersham Bioscience)

Se cargaron aproximadamente 0,5 µg de anticuerpo en el gel hinchado, y se llevó a cabo isoelectroenfoque usando PhastSystem (Amersham Bioscience). Las muestras se añadieron al gel en la Etapa 2 en el programa indicado posteriormente. Se usó un kit de calibración de pI como marcadores de pI (Amersham Bioscience).

Etapas: 1: 2.000 V, 2,5 mA, 3,5 W, 15 °C, 75 Vh
Etapa 2: 200 V, 2,5 mA, 3,5 W, 15 °C, 15 Vh
Etapa 3: 2.000 V, 2,5 mA, 3,5 W, 15 °C, 410 Vh

Después de la electroforesis, el gel se fijó con TCA al 20 %, y después se tiñó con plata usando kit de tinción de plata, proteína (Amersham Bioscience) de acuerdo con el protocolo adjunto. Después de teñir, el punto isoelectrónico de cada anticuerpo como una muestra de ensayo se calculó basándose en los puntos isoelectrónicos conocidos de los marcadores de pI. Se muestran patrones electroforéticos de isoelectroenfoque de pI alto y pI bajo en las Figuras 50 y 51, respectivamente.

(a) Modificaciones que dan como resultado un aumento del punto isoelectrónico

Se preparó Hspu2.2 (Hu2.2) (SEQ ID NO: 200) modificando adicionalmente H15 por Q43K, D52N y Q107R. Se preparó Lspu2.2 (Lu2.2) (SEQ ID NO: 206) modificando adicionalmente L4 por E17Q, Q27R, y Q105R, así como S25A (sustitución de S25 en CDR2 por A, que es altamente frecuente en la línea germinal). El valor de T_m y valor del punto isoelectrónico del anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2) que consiste en Hspu2.2 (Hu2.2) y Lspu2.2 (Lu2.2) se determinaron como 76,8 °C y 9,6, respectivamente. El valor del punto isoelectrónico del anticuerpo H0L0 es 8,9. Por lo tanto, el valor del punto isoelectrónico se ha aumentado en 0,7 en el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2).

(b) Modificaciones que dan como resultado una reducción del punto isoelectrónico

Se preparó Hspd1.8 (Hd1.8) (SEQ ID NO: 199) modificando adicionalmente H15 por K19T, Q43E, K63S, K65Q y

G66D. Se preparó Lspd1.6 (Ld1.6) (SEQ ID NO: 205) modificando adicionalmente L4 por Q27E, sustitución de KISRVE por TISSLQ en las posiciones 79 a 84 en FR3 de L4, y la misma modificación S25A que en Lspu2.2 (Lu2.2). El valor de T_m y valor de punto isoeléctrico del anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) que consiste en Hspd1.8 (Hd1.8) y Lspd1.6 (Ld1.6) se determinaron como 72,6 °C y 7,4, respectivamente. El valor del punto isoeléctrico del anticuerpo H0L0 es 8,9. Por lo tanto, el valor del punto isoeléctrico se ha reducido en 1,5 en el anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6).

(2) Evaluación de mutaciones puntuales del anticuerpo H0L0 con respecto a actividad de unión por ELISA competitivo

El anticuerpo H0L0 y sus mutantes puntuales se purificaron como se ha descrito en (1) y se evaluaron mediante ELISA competitivo. La concentración de polipéptido de núcleo GPC3 soluble (SEQ ID NO: 207) se ajustó a 1 µg/ml. Se añadieron 100 µl de la solución del polipéptido a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. La placa se incubó durante una noche a 4 °C para inmovilizar el polipéptido de núcleo GPC3 soluble en la placa. La placa inmovilizada con el polipéptido de núcleo GPC3 soluble se lavó tres veces con tampón de lavado usando SkanWasher 400 (Molecular Devices). Después se añadieron 200 µl de tampón de bloqueo, la placa se bloqueó a 4 °C durante una noche o más. Después, la placa inmovilizada con el polipéptido de núcleo GPC3 soluble se lavó tres veces con tampón de lavado usando SkanWasher 400. A continuación, se mezclaron diversas concentraciones del anticuerpo H0L0 o sus mutantes puntuales con una concentración final de anticuerpo H0L0 biotinilado 0,3 µg/ml, y cada mezcla se añadió a la placa a 100 µl/pocillo. El anticuerpo H0L0 se biotiniló usando Kit de Marcage de biotina (Roche) de acuerdo con el protocolo adjunto. La placa se incubó a temperatura ambiente durante una hora, y después se lavó cinco veces con tampón de lavado usando SkanWasher 400 (Molecular Devices). Se diluyó fosfatasa alcalina de cabra anti estreptavidina (Zymed) 20.000 veces con tampón de sustrato y se añadió a la placa a 100 µl/pocillo. La placa se incubó a temperatura ambiente durante una hora, y después se lavó cinco veces con tampón de lavado usando SkanWasher 400. La concentración de sustrato de fosfatasa (Sigma) se ajustó a 1 mg/ml usando el tampón de sustrato, y la solución se añadió a la placa a 100 µl/pocillo. La placa se incubó durante una hora. La absorbancia de la mezcla de reacción a 405 nm en cada pocillo se determinó usando Benchmark Plus (Bio-Rad). La longitud de onda de absorbancia de referencia usada fue de 655 nm.

Como se muestra en la Figura 52, la actividad de unión a antígeno del anticuerpo H15L4 fue comparable a la del anticuerpo H0L0 que se sometió a modificación. Además, como se muestra en la Fig. 53, la actividad de unión a antígeno del anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2) fue comparable a la del anticuerpo H0L0 que se sometió a modificación. Además como se muestra en la Figura 54, la actividad de unión a antígeno del anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6) fue comparable a la del anticuerpo H0L0 que se sometió a modificación.

[Ejemplo Experimental de Referencia 22] Alteración del gen del transportador de fucosa en células CHO

(1) Construcción de vectores de dirección

(1-1) Construcción de vector KO1

Se añadió un sitio *Bam*HI y una secuencia TGCGC al extremo 5' del codón de inicio del gen de resistencia a higromicina (*Hygr*) mediante PCR usando pcDNA3.1/*Hygro* (Invitrogen) y los cebadores Hyg5-BH y Hyg3-NT para hacer lo mismo que en la secuencia adyacente al extremo 5' del codón de inicio del gen de transportador de fucosa. Se añadió un sitio *Not*I al extremo 3' de la región que contenía hasta la señal de adición de poliA de SV40. Se escindió el *Hygr* resultante.

Cebador directo

Hyg5-BH: 5'-GGATCCTGCGCATGAAAAAGCCTGAACTCACC-3' (SEQ ID NO: 208)

Cebador inverso

Hyg3-NT: 5'-GCGGCCGCCTATTCCTTTGCCCTCGGACG-3' (SEQ ID NO: 209)

El vector de dirección del transportador de fucosa ver.1 (denominado en el presente documento "vector KO1") se construyó insertando en el vector pMC1DT-A (Yagi T, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87: 9918-22) los segmentos 5' (*Sma*I en la posición 2780 a *Bam*HI en la posición 4232 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 210) y 3' (de la posición 4284 a *Sac*I en la posición 10934) del transportador de fucosa y un fragmento de *Hygr*. La característica del vector KO1 es que *Hygr* se expresa a partir del promotor de transportador de fucosa cuando se produce recombinación homóloga porque no se une ningún promotor al fragmento de *Hygr*. Sin embargo, *Hygr* no siempre se expresa lo suficiente para adquirir resistencia a higromicina B cuando solamente se introduce una única copia del vector en una célula por recombinación homóloga. El vector KO1 se introdujo en células después de digestión con *Not*I. Se esperaba que el transportador de fucosa perdiera 41 pares de bases del exón 1 incluyendo el codón de inicio de la introducción del vector KO1, lo que daría como resultado la pérdida de su función.

(1-2) Construcción de pBSK-pk-1-*Hygr*

Se escindió el promotor del gen *pgk-1* de ratón de un vector pKJ2 (Popo H, Biochemical Genetics (1990) 28: 299-

308) con *EcoRI* y *PstI*, y se clonó en pBluescript (Stratagene) en el sitio entre *EcoRI* y *PstI* para preparar pBSK-pgk-1. Se añadieron un sitio *EcoT22I* y una secuencia de Kozak al extremo 5' de *Hygr* por PCR usando pcDNA3.1/Hygro y los cebadores Hug5-AV y Hyg3-BH. Se añadió un sitio *BamHI* al extremo 3' de la región que contenía hasta la señal de adición de poliA de SV40. Se escindió el *Hygr* resultante.

Cebador directo

Hyg5-AV: 5'-ATGCATGCCACCATGAAAAAGCCTGAACTCACC-3' (SEQ ID NO: 211)

Cebador inverso

Hyg3-BH: 5'-GGATCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTC-3' (SEQ ID NO: 212)

El fragmento de *Hygr* (*EcoT22I*-*BamHI*) se insertó en pBSK-pgk-1 en el sitio *PstI*-*BamHI* para preparar pBSK-pgk-1-*Hygr*.

(1-3) Construcción del vector KO2

El vector de dirección de transportador de fucosa ver.2 (denominado en el presente documento "vector KO2") se construyó insertando en un vector pMC1DT-A los segmentos 5' (*SmaI* en la posición 2780 hasta *BamHI* en la posición 4232 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 210) y 3' (de la posición 4284 a *SacI* en la posición 10934) del transportador de fucosa, y un fragmento de pgk-1-*Hygr*. A diferencia del vector KO1, el vector KO2 porta *Hygr* unido al promotor del gen de pgk-1. Por lo tanto, una vez que se ha introducido una única copia del vector en células mediante recombinación homóloga, las células adquieren resistencia a higromicina B. El vector KO2 se introdujo en células después de digestión con *NotI*. Se esperaba que el transportador de fucosa perdiera 46 pares de bases del exón 1 incluyendo el codón de inicio mediante introducción del vector KO2, que daría como resultado la pérdida de su función.

(1-4) Construcción de pBSK-pgk-1-Puror

Se digirió un vector pPUR (BD Biosciences) con *PstI* y *BamHI*. El fragmento escindido (*Puror*) se insertó en pBSK-PGK-1 en el sitio *PstI*-*BamHI* para preparar pBSK-pgk-1-*Puror*.

(1-5) Construcción de vector KO3

El vector de dirección de transportador de fucosa ver.3 (denominado en el presente documento "vector KO3") se construyó insertando en un vector pMC1DT-A los segmentos 5' (*SmaI* en la posición 2780 a *BamHI* en la posición 4232 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 210) y 3' (de la posición 4284 a *SacI* en la posición 10934) del transportador de fucosa, y un fragmento de pgk-1-*Puror*. Se unió una secuencia para hibridar con el cebador de exploración indicado posteriormente con el extremo 3' de pgk-1-*Puror* por adelantado. El vector KO3 se introdujo en células después de digestión con *NotI*. Se esperaba que el transportador de fucosa perdiera 46 pares de bases del exón 1 incluyendo el codón de inicio a partir de la introducción del vector KO3, lo que daría como resultado la pérdida de su función.

Cebador inverso

RSGR-A: 5'-GCTGTCTGGAGTACTGTGCATCTGC-3' (SEQ ID NO: 213)

El gen de transportador de fucosa se desactivó usando los tres tipos de vectores de dirección descritos anteriormente.

(2) Introducción de vectores en células CHO

Se complementó CHO-S-SFMII HT- (Invitrogen) con 1/100 de volumen de suplemento HT (100x) (Invitrogen) y penicilina-estreptomycin (Invitrogen), y se usó como un medio de cultivo (en lo sucesivo en el presente documento denominado "SFMII(+)"). Se pasó una línea celular CHO DXB11 usando el medio. También se usó SFMII(+) para cultivar las células después de transferencia génica. Se suspendieron 8×10^6 células CHO en 0,8 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (en lo sucesivo en el presente documento abreviada "PBS"; Invitrogen). La suspensión celular se combinó con 30 µg de un vector de dirección, y se transfirió a una cubeta Gene Pulser (4 mm) (Bio-Rad). Después de diez minutos de incubación en hielo, el vector se introdujo en las células por electroporación en las condiciones de 1,5 kV y 25 µFD usando Gen Pulser-II (Bio-Rad). Después de la transferencia de vector, las células se suspendieron en 200 ml de medio SFMII(+) y se sembraron en veinte placas de fondo redondo de 96 pocillos (Iwaki) a 100 µl/pocillo. Las placas se incubaron en un incubador de CO₂ a 37 °C durante 24 horas, y después se añadió un fármaco a las mismas.

(3) Primera desactivación

El vector KO1 o KO2 se introdujo en células CHO. Se llevó a cabo selección 24 horas después de la transferencia génica usando higromicina B (Invitrogen). Se disolvió higromicina B a una concentración de 0,3 mg/ml en SFMII(+), y se añadió a cada pocillo una alícuota de 100 µl.

(4) Exploración por PCR con respecto a recombinantes homólogos(4-1) Preparación de muestras de PCR

Se exploraron recombinantes homólogos mediante PCR. Se cultivaron células CHO usadas en la exploración en placas de fondo plano de 96 pocillos. Después de retirar los sobrenadantes de cultivo, se añadieron 50 µl de tampón de lisis celular a cada pocillo y las placas se incubaron a 55 °C durante dos horas. Después se inactivó proteinasa K calentando a 95 °C durante 15 minutos. Las muestras resultantes se usaron como moldes de PCR. La composición de tampón de lisis celular por pocillo fue: 5 µl de tampón LA II 10x (adjunto a Takara LATaq), 2,5 µl de NP-40 10 % (Roche), 4 µl de proteinasa K (20 mg/ml; Takara) y 38,5 µl de agua destilada (Nacalai Tesque).

(4-2) Condiciones de PCR

Las mezclas de PCR consistían en 1 µl de una muestra de PCR descrita anteriormente, 5 µl de tampón La II 10x, 5 µl de MgCl₂ (25 mM), 5 µl de dNTP (2,5 mM), 2 µl de cada uno de los cebadores (10 µM cada uno), 0,5 µl de LA Taq (5 U/µl), y 29,5 µl de agua destilada (50 µl en total). Se usaron TP-F4 y THygro-R1 como cebadores de PCR en la exploración con respecto a células en las que se ha introducido el vector KO1 y se usaron TP-F4 y THygro-F1 en la exploración con respecto a células en las que se ha introducido el vector KO2.

Las condiciones de PCR usadas para evaluar células en las que se ha introducido el vector KO1 fueron: precalentamiento a 95 °C durante un minuto y 40 ciclos de amplificación de 95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 60 °C durante dos minutos, seguido de calentamiento a 72 °C durante siete minutos. Las condiciones de PCR usadas para evaluar células en las que se introdujo vector KO2 fueron: precalentamiento a 95 °C durante un minuto y 40 ciclos de amplificación de 95 °C durante 30 segundos y 70 °C durante tres minutos, seguido de calentamiento a 70 °C durante siete minutos.

Los cebadores se muestran a continuación. En muestras celulares en las que la recombinación homóloga está mediada por el vector KO1, el tamaño del ADN amplificado es de aproximadamente 1,6 kb. En muestras celulares en las que la recombinación homóloga está mediada por el vector KO2, el tamaño del ADN amplificado es de aproximadamente 2,0 kb. El cebador TP-F4 se ha diseñado para colocarse fuera del vector y dentro de la región genómica 5' del transportador de fucosa. Los cebadores THygro-F1 y THygro-R1 se han diseñado para colocarse dentro de *Hygr* del vector.

Cebadores directos (KO1 y KO2)

TP-F4: 5'-GGAATGCAGCTTCCTCAAGGGACTCGC-3' (SEQ ID NO: 214)

Cebador inverso (KO1)

THygro-R1: 5'-TGCATCAGGTCCGAGACGCTGTGCAAC-3' (SEQ ID NO: 215)

Cebador inverso (KO2)

THygro-F1: 5'-GCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGC-3' (SEQ ID NO: 216)

(5) Resultados de exploración por PCR

Se analizaron 918 células con vector KO1 introducido, y se evaluó que solamente una era una célula recombinante homóloga (la frecuencia de recombinación homóloga fue de aproximadamente 0,1 %). Se analizaron 537 células con el vector KO2 introducido, y se evaluó que 17 células eran células recombinantes homólogas (la frecuencia de recombinación homóloga fue aproximadamente 3,2 %).

(6) Análisis de transferencia de Southern

Además, se usó también transferencia de Southern para confirmar las células recombinantes. Se prepararon 10 µg de ADN genómico a partir de células cultivadas de acuerdo con un método convencional y se analizaron mediante transferencia de Southern. Se preparó una sonda de 387 pb a partir de la región de posiciones 2113 a 2500 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 210 mediante PCR usando el par de cebadores mostrado posteriormente, y se usó en transferencia de Southern para confirmar las células recombinantes. Los ADN genómicos se digirieron con *Bgl*II.

Cebador directo

Bgl-F: 5'-TGTGCTGGGAATTGAACCCAGGAC-3' (SEQ ID NO: 217)

Cebador inverso

Bgl-R: 5'-CTACTTGTCTGTGCTTTCTTCC-3' (SEQ ID NO: 218)

La digestión con *Bgl*II produjo una banda de aproximadamente 3,0 kb de transportador de fucosa cromosómico y bandas de aproximadamente 4,6 kb y 5,0 kb de cromosomas que han experimentado recombinación homóloga mediada por los vectores KO1 y KO2, respectivamente. Se usaron en los experimentos una y siete células que habían experimentado recombinación homóloga mediada por los vectores KO1 y vectores KO2, respectivamente. La única línea celular obtenida usando el vector KO1 se denominó 5C1. De hecho, análisis posteriores revelaron que la

línea celular incluía diferentes poblaciones celulares. Por lo tanto, la línea celular se volvió a clonar por dilución limitante y después se usó en experimentos posteriores. Una de las líneas celulares obtenidas usando el vector KO2 se denominó 6E2.

5 (7) Segunda desactivación

Se estableció una línea celular completamente deficiente en el gen del transportador de fucosa usando tres tipos de vectores de una línea celular en la que los vectores KO1 y KO2 mediaron con éxito en la recombinación homóloga. Las combinaciones de vector y línea celular fueron las siguientes. Método 1, vector KO2 y línea celular 5C1 (KO1);
10 Método 2, vector KO2 y línea celular 6E2 (KO2); y Método 3, vector KO3 y línea celular 6E2 (KO2). Los vectores se introdujeron en células de las líneas celulares respectivas. Se llevó a cabo selección 24 horas después de la transferencia del vector usando higromicina B y puromicina (Nacalai Tesques). La concentración final de higromicina B fue 1 mg/ml en el Método 1 y 7 mg/ml en el Método 2. En el Método 3, se añadieron higromicina B y puromicina a concentraciones finales de 0,15 mg/ml y 8 µg/ml, respectivamente.

15 (8) Exploración por PCR con respecto a recombinantes homólogos

Se prepararon muestras por el mismo método descrito anteriormente. Para la exploración en el Método 1, se usaron ambos de los métodos de PCR descritos anteriormente para detectar células que habían experimentado recombinación homóloga mediada con los vectores KO1 y KO2. Se colocaron TPS-F1 y SHygro-R1 en las regiones de posiciones 3924 a 3950 y 4248 a 4274 en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 210. Estos cebadores de PCR se diseñaron para el Método 2, y se usaron para amplificar una región de 350 pb del gen de transportador de fucosa que es deficiente en el vector KO2. En consecuencia, cuando no se amplificó la región de 350 pb en la exploración por PCR del Método 2, se consideró que las células eran completamente deficientes en el gen de transportador de fucosa. Las condiciones de PCR usadas fueron: precalentamiento a 95 °C durante un minuto y 35 ciclos de amplificación de 95 °C durante 30 segundos y 70 °C durante un minuto, seguido de calentamiento a 70 °C durante siete minutos.

Cebador directo
30 TPS-F1: 5'-CTCGACTCGTCCCTATTAGGCAACAGC-3' (SEQ ID NO: 219)
Cebador inverso
SHygro-R1: 5'-TCAGAGGCAGTGGAGCCTCCAGTCAGC-3' (SEQ ID NO: 220)

Los cebadores directo e inverso usados en el Método 3 fueron TP-F4 y RSGR-A, respectivamente. Las condiciones de PCR usadas fueron: precalentamiento a 95 °C durante un minuto y 35 ciclos de amplificación de 95 °C durante 30 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante dos minutos, seguido de calentamiento a 72 °C durante siete minutos. Se amplificó un ADN de aproximadamente 1,6 kb cuando la muestra es células que han experimentado recombinación homóloga mediada por el vector KO3. La PCR se llevó a cabo para detectar células que habían experimentado recombinación homóloga mediada por el vector KO3, así como para confirmar que la recombinación homóloga mediada por el vector KO2 permanecía.

40 (9) Resultados de exploración por PCR

Se analizaron 616 células por el Método 1 y se evaluó que 18 eran recombinantes homólogos (la frecuencia de recombinación homóloga fue de aproximadamente 2,9 %). Se analizaron 524 células por el Método 2, y se evaluó que dos eran recombinantes homólogos (la frecuencia de recombinación homóloga fue de aproximadamente 0,4 %). Además, se analizaron 382 células por el Método 3, y se evaluó que siete eran recombinantes homólogos (la frecuencia de recombinación homóloga fue de aproximadamente 1,8 %).

50 (10) Análisis de transferencia de Southern

Como resultado del análisis de acuerdo con el método descrito anteriormente, se descubrió que una de las líneas celulares analizadas era completamente deficiente en el gen de transportador de fucosa. En la primera desactivación, los resultados de PCR y análisis de transferencia de Southern fueron coherentes entre sí. Sin embargo, el resultado de PCR no fue coherente con la transferencia de Southern en la segunda desactivación.

(11) Análisis de expresión de fucosa

Además, se analizaron 26 líneas celulares que se había evaluado que eran recombinantes homólogos por PCR con respecto a expresión de fucosa. Se tiñeron 1×10^6 células usando 100 µl de PBS que contenía 5 µg/ml de aglutinina de *Lens culinaris*, conjugado de FITC (Vector Laboratories), FBS 2,5 % y azida sódica 0,02 % (en lo sucesivo en el presente documento denominada "solución de lisis de FACS") en hielo durante una hora. Después las células se lavaron tres veces con solución de lisis de FACS y se ensayaron usando FACSCalibur (Becton Dickinson). El resultado de análisis de transferencia de Southern mostró que el nivel de expresión de fucosa se redujo solamente en la línea celular FTP-KO que se había evaluado que era completamente deficiente en el gen de transportador de fucosa.

[Ejemplo Experimental de Referencia 23] Establecimiento de células productoras de anticuerpo derivadas de la línea FTP-KO y purificación de anticuerpo producido por las células

Se preparó higromicina B a una concentración final de 1 mg/ml en medio SFMII(+). La línea celular deficiente en transportador de fucosa (célula FT-KO; nombre del clon, 3F2) obtenida como se describe en el Ejemplo 21 se cultivó en este medio. Se suspendieron 8×10^6 células de 3F2 en 0,8 ml de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco. La suspensión celular se combinó con 25 µg del vector de expresión para anticuerpo de glipicano 3 humanizado y se transfirió a una cubeta Gene Pulser. Después de diez minutos de incubación en hielo, el vector se introdujo en las células por electroporación en las condiciones de 1,5 kV y 25 µFD usando Gene Pulser II. Después de la transferencia del vector, las células se suspendieron en 40 ml de medio SFMII(+), y se sembraron en una placa de fondo plano de 96 pocillos (Iwaki) en una cantidad de 100 µl/pocillo. La placa se incubó a 37 °C en un incubador de CO₂ durante 24 horas, y después se añadió geneticina (Invitrogen) a la misma a una concentración final de 0,5 mg/ml. Los niveles de anticuerpo producido por las células resistentes a fármaco se determinaron para establecer líneas celulares productoras de anticuerpo de glipicano 3 humanizado.

Se recogieron sobrenadantes de cultivos de las células productoras de anticuerpo, y se cargaron en una columna de rProteína A Hitrap (Pharmacia) usando una bomba P-1 (Pharmacia). Después de lavarse la columna con tampón de unión (fosfato sódico 20 mM (pH 7,0)), se eluyó anticuerpo unido con tampón de elución (glicina 0,1 M-HCl (pH 2,7)). Inmediatamente, los eluatos se neutralizaron con tampón de neutralización (Tris-HCl 1M (pH 9,0)). Las fracciones de anticuerpo eluidas se seleccionaron mediante ensayo de proteína DC (Bio-Rad), y las fracciones agrupadas se concentraron hasta aproximadamente 2 ml usando Centriprep YM 10 (Millipore). A continuación, las soluciones concentradas se sometieron a filtración en gel usando Superdex 200 26/60 (Pharmacia) equilibrado con tampón de ácido acético 20 mM (pH 6,0) que contenía NaCl 150 mM. Se recogieron fracciones monoméricas pico de los eluatos, y se concentraron usando Centriprep YM 10. Después de filtración con Unidad de Filtro de 0,22 µm MILLEX-GW (Millipore), las soluciones concentradas se almacenaron a 4 °C. Las concentraciones de anticuerpos purificados se determinaron mediante cálculo usando el coeficiente de extinción molar y la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm.

[Ejemplo Experimental de Referencia 24] Análisis de cadenas de azúcares ligadas a anticuerpo anti glipicano 3 humanizado producido por células FT-KO

(1) Preparación de cadenas de azúcar marcadas con 2-aminobenzamida (cadenas de azúcar marcadas con 2-AB)

Los anticuerpos producidos por las células FT-KO de la presente invención y anticuerpos producidos por células CHO como muestra de control se trataron con N-glucosidasa F (Roche Diagnostics) para liberar las cadenas de azúcar de la proteína (Weitzhandler M. *et al*, Journal of Pharmaceutical Sciences (1994) 83(12): 1670-1675). Después de desproteinización usando etanol (Schenk B. *et al*, The Journal of Clinical Investigation (2001) 108(11): 1687-1695), las cadenas de azúcar libres se concentraron hasta su sequedad, y se marcaron con fluorescencia con 2-aminopiridina (Bigge JC *et al*, Analytical Biochemistry (1995) 230(2): 229-238). El reactivo se retiró de las cadenas de azúcar marcadas con 2-AB mediante extracción de fase sólida usando un cartucho de celulosa. Después de concentración por centrifugación, se obtuvieron cadenas de azúcar marcadas con 2-AB purificadas para su uso en los análisis. A continuación, las cadenas de azúcar marcadas con 2-AB purificadas se trataron con β-galactosidasa (Seikagaku Co.) para obtener cadenas de azúcar marcadas con agalactosil 2-AB.

(2) Análisis de cadenas de azúcar marcadas con agalactosil 2-AB mediante HPLC de fase normal

Se prepararon cadenas de azúcar marcadas con agalactosil 2-AB mediante el método anterior, usando como los materiales de partida cadenas de azúcares libres de anticuerpos producidos por las células FT-KO de la presente invención o anticuerpos producidos por células CHO (control). Las cadenas de azúcar se analizaron mediante HPLC de fase normal usando una columna de amida TSKgel Amida-80 (Tosoh Co.), y los cromatogramas se compararon entre sí. En los anticuerpos producidos por células CHO, el componente principal de cadena de azúcar fue G(0) y se estimó que G(0)-Fuc que no tenía fucosa representaba aproximadamente el 4 % de cadenas de azúcares totales basándose en el cálculo de la relación de área pico. Por otro lado, en los anticuerpos producidos por las células FT-KO, G(0)-Fuc fue el componente principal, y basándose en el cálculo de la relación de área de pico, 90 % o más de las cadenas de azúcares totales no tenían fucosa en los anticuerpos producidos por ninguna de las líneas celulares productoras de anticuerpo.

Tabla 17

RELACIÓN RELATIVA DE CADENA DE AZÚCAR MARCADA CON AGALACTOSIL 2-AB ESTIMADA POR HPLC DE FASE NORMAL				
CADENA DE AZÚCAR	CHO	FT-KO-a	FT-KO-b	FT-KO-c
G(0)-Fuc	4,0 %	92,4 %	92,5 %	93,2 %
G(0)	96,0 %	7,6 %	7,5 %	6,8 %

[Ejemplo 25] Establecimiento de líneas celulares que expresan de forma estable anticuerpo humanizado H0L0 o sus mutantes puntuales

Los genes que codifican anticuerpos se clonaron en vectores de expresión. Los anticuerpos fueron: Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2) y Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6), que se prepararon como anticuerpos modificados del anticuerpo H0L0 por el método descrito en el Ejemplo 21; y el anticuerpo H0L0, que se usó para dichas modificaciones. Los genes respectivos que codificaban la cadena pesada y cadena ligera de cada anticuerpo se clonaron en vectores de expresión diferentes para expresar los genes. Se seleccionaron dos tipos de vectores de expresión para llevar a cabo una combinación deseada de genes que codifican la cadena pesada y cadena ligera como se ha descrito anteriormente, y después de digestión con *PvuI*, se introdujeron por electroporación en células de la línea FTP-KO producida como se ha descrito en el Ejemplo Experimental de Referencia 22.

Las líneas celulares transformadas que producían de forma estable el anticuerpo H0L0 o sus anticuerpos modificados se produjeron mediante electroporación usando Gene Pulser II (Bio-Rad). Se mezclaron 10 µg de cada uno de los ADN plasmídicos de expresión para las cadenas pesada y ligera, que proporcionaban una combinación deseada de cadenas pesadas y ligeras, con 0,75 ml de suspensión de células CHO (1×10^7 células/ml) en PBS. La mezcla se incubó en hielo durante diez minutos, se transfirió a una cubeta Gene Pulser II, y después se pulsó eléctricamente a 1,5 kV y 25 µFD. La mezcla pulsada se incubó a temperatura ambiente durante diez minutos, y después se suspendió en medio CHO-S-SFMII/HT 1 %/PS 1 %. El mismo medio que se usó para preparar diluciones 5x, 10x y 50x, y las suspensiones se separaron en alícuotas (100 µl) en cada pocillo de placas de cultivo de 96 pocillos. Las placas se incubaron en CO₂ 5 % en un incubador de CO₂ durante 24 horas. Después, se añadieron genética (GIBCO) y zeocina (Invitrogen) a concentraciones finales de 500 y 600 µg/ml a cada pocillo, respectivamente. Las placas se incubaron adicionalmente durante dos semanas. Se seleccionaron colonias de células transformadas resistentes tanto a genética como a zeocina cultivando en el mismo medio complementado con genética 500 µg/ml (GIBCO) y zeocina 600 µg/ml (Invitrogen). Las concentraciones de anticuerpo en sobrenadantes de cultivo de células transformadas seleccionadas de este modo se evaluaron usando BiacoreQ (Biacore). En consecuencia, se establecieron líneas transformantes que expresaban en alto grado un anticuerpo deseado. Las concentraciones de anticuerpo en sobrenadantes de cultivo se determinaron de acuerdo con el protocolo adjunto a BiacoreQ (Biacore).

[Ejemplo 26] Ensayo de eficacia farmacológica del anticuerpo humanizado H0L0 y sus mutantes puntuales mediante modelo *in vivo*

(1) Mantenimiento de líneas celulares que se someten a trasplante en un modelo *in vivo*

La línea celular Hep G2 (ATCC) se usó y se mantuvo cultivando en Medio de Eagle Esencial Mínimo (Sigma) complementado con FBS 10 %, piruvato sódico MEM 1 mmol/l (Invitrogen) y aminoácidos no esenciales de MEM 1 mmol/l (Invitrogen) (denominado en lo sucesivo en el presente documento "medio de pase").

(2) Preparación de modelo de ratón con Hep G2 injertado

Se preparó una suspensión celular Hep G2 a 5×10^7 células/ml usando una solución que contenía una relación 1:1 del medio de pase y Matriz Matrigel (BD Bioscience). Se trasplantaron 100 µl de la suspensión celular (5×10^6 células/cabeza) por vía subcutánea en un sitio abdominal en ratones SCID (macho, cinco semanas de edad) (CLEA Japan Inc.). El día antes del trasplante celular, se administraron 100 µl de un anticuerpo anti asialo GM1 (Wako Pure Chemical Industries; el contenido de un vial se disolvió en 5 ml de la solución) en las cavidades peritoneales de los ratones. El volumen tumoral se calculó basándose en la fórmula:

$$(\text{Volumen del tumor}) = (\text{eje mayor}) \times (\text{eje menor}) \times (\text{eje menor})/2.$$

Cuando el volumen tumoral medio alcanzó de 130 a 330 mm³, se evaluó que el ratón era aceptable para el modelo.

(3) Preparación de muestras que contenían cada anticuerpo de ensayo para administración

El día de la administración, se prepararon muestras para administración usando solución salina fisiológica de modo que cada una contenía uno de los anticuerpos H0L0, Hu2.2Lu2.2 y Hd1.8Ld1.6 a 0,5 mg/ml (grupo al que se administró un anticuerpo a 5 mg/kg) o 0,1 mg/ml (grupo al que se administró un anticuerpo a 1 mg/kg).

(4) Administración de muestras que contienen anticuerpo para administración

27 días después del trasplante de células Hep G2 al modelo de ratón preparado como se ha descrito anteriormente en (2), las muestras preparadas como se ha descrito anteriormente en (3) se administraron a una dosis de 10 ml/kg a la vena de la cola una vez a la semana durante tres semanas. Como control negativo, se administró solución salina fisiológica de la misma manera a una dosis de 10 ml/kg a la vena de la cola una vez a la semana durante tres semanas. Cada grupo incluyó cinco ratones, y se administró con una muestra que contenía uno cualquiera de los anticuerpos de ensayo respectivos. Casi simultáneamente con la administración, se recogió sangre venosa de tres

ratones en cada uno de los grupos respectivos como muestras de ensayo para determinar la concentración de cada anticuerpo en sangre de ratón. Específicamente, se recogió sangre de la vena de metatarso dorsal en dos puntos temporales: la mitad una hora después de la primera administración e inmediatamente antes de la segunda administración. Se heparinizaron 20 µl de sangre recogida y se obtuvo plasma por centrifugación.

(5) Evaluación de anticuerpos de ensayo con respecto a efecto antitumoral

El efecto antitumoral de cada anticuerpo de ensayo en un ratón modelo al que se trasplantó cáncer de hígado humano se evaluó midiendo el volumen tumoral una semana después de la administración final de las muestras. El resultado mostrado en la Figura 55 demuestra la tendencia a que el efecto se potencie con el anticuerpo Hspd1.8Lspd1.6 (Hd1.8Ld1.6), y el efecto se altera con el anticuerpo Hspu2.2Lspu2.2 (Hu2.2Lu2.2).

(6) Concentración de cada anticuerpo de ensayo en sangre

Las concentraciones de anticuerpos de ensayo en plasma de ratón se determinaron de acuerdo con el método de ELISA descrito en el Ejemplo 21. Se prepararon muestras con una concentración en plasma de 12,8, 6,4, 3,2, 1,6, 0,8, 0,4 o 0,2 µg/ml como patrones de calibración. Las muestras patrón y muestras de ensayo de plasma de ratón diluidas apropiadamente a una concentración deseada se separaron en alícuotas en inmunoplasmas (placa Nunc-Inmuno, MaxiSoup (Nalge Nunc International)) inmovilizadas con núcleo de glicoproteína 3 soluble (Chugai Pharmaceutical Co. Ltd.). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Después, se separó en alícuotas secuencialmente IgG-BIOT de cabra anti humano (Southern Biotechnology Associates) y conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics) y se consiguió desarrollo del color usando como sustrato Sistema de Sustratos de Fosfatasa BluePhos Microwell (Kirkegaard & Perry Laboratories). El grado de desarrollo del color de la mezcla de reacción en cada pocillo se calculó midiendo la absorbancia de la mezcla de reacción a 650 nm en un lector de microplacas. Las concentraciones de anticuerpo en plasma de ratón se calcularon usando software de análisis SoftMax Pro (Molecular Devices) basándose en las curvas de calibración preparadas a partir de la absorbancia de las muestras patrón.

Las concentraciones en plasma de ratón 30 minutos y siete días después de la administración se muestran en la Figura 56. Se demostró que con cualquier dosificación de anticuerpo, cuanto menor sea el punto isoeléctrico de un anticuerpo de ensayo, mayor será la concentración de anticuerpo en plasma siete días después de la administración.

[Ejemplo 27] ADCC de cada anticuerpo de ensayo cuando se usan células mononucleares de sangre periférica humana como células efectoras

Se ensayó la ADCC de cada anticuerpo de ensayo usando células mononucleares de sangre periférica humana (denominadas en lo sucesivo en el presente documento "PBMC humanas") como células efectoras por el procedimiento descrito posteriormente.

(1) Preparación de soluciones de PBMC humanas

Usando jeringas precargadas con 200 µl de 1.000 unidades/ml de solución de heparina (Novo-Heparin 5000 unidades para inyección; Novo Nordisk), se recogieron 50 ml de sangre periférica de voluntarios sanos (hombres adultos) afiliados con Chugai Pharmaceutical Co. Ltd. La sangre periférica se diluyó dos veces con PBS(-), y se dividió en cuatro partes iguales, cada una de las cuales se transfirió a un tubo de separación de leucocitos precentrifugado Leucosep (Greiner Bio-One) que contenía 15 ml de Ficoll Paque PLUS. Los tubos de separación que contenían una alícuota de la sangre periférica se centrifugaron a 2150 rpm y temperatura ambiente durante diez minutos. Después, se recogieron las fracciones de células mononucleares resultantes. Las células en cada fracción se lavaron una vez con Medio de Eagle modificado por Dulbecco (Sigma) que contenía FBS 10 % (denominado en lo sucesivo en el presente documento "FBS 10 %/D-MEM"), y después se suspendió a una densidad de 5×10^6 células/ml en FBS 10 %/D-MEM. Las suspensiones celulares se usaron como soluciones de PBMC humanas en los experimentos posteriores.

(2) Preparación de células diana

Se separaron células Hep G2 de placas, y después se sembraron a 1×10^4 células/pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos. Las placas se incubaron en gas de dióxido de carbono 5 % en un incubador CO₂ a 37 °C durante una noche. Al día siguiente, se añadieron 5,55 MBq de Cr-51 a cada pocillo de las placas. Después, las placas se incubaron con gas de dióxido de carbono 5 % en un incubador de CO₂ a 37 °C durante tres horas. Las células Hep G2 en las placas se usaron como células diana en el ensayo de ADCC posterior.

(3) Ensayo de liberación de cromo (ADCC)

Se evaluó la ADCC basándose en la velocidad de liberación de cromo específica determinada por ensayo de liberación de cromo. Las células diana preparadas como se ha descrito en (2) se lavaron con medio. Se añadieron

100 µl de los anticuerpos H0L0, Hu2.2Lu2.2 o Hd1.8Ld1.6 a las células a diversas concentraciones (0, 0,004, 0,04, 0,4, 4 y 40 µg/ml). Después de incubarse las placas a temperatura ambiente durante 15 minutos, se retiraron las soluciones de anticuerpo. Después, se añadieron 100 µl de medio de cultivo a cada pocillo. Las placas se incubaron con gas de dióxido de carbono 5 % en un incubador de CO₂ a 37 °C durante una hora. Se añadieron 100 µl de solución de PBMC humana preparada como se ha descrito en (1) a cada pocillo (5 x 10⁵ células/pocillo). Las placas se incubaron con gas dióxido de carbono 5 % en un incubador de CO₂ a 37 °C durante cuatro horas, y después se centrifugaron. Se midieron 100 µl de sobrenadante de cultivo en cada pocillo de las placas con respecto a radiactividad usando un contador gamma. La velocidad de liberación de cromo específica se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$[\text{Velocidad de liberación de cromo específica (\%)}] = (A-C) \times 100/(B-C).$$

En esta fórmula, "A" representa la radiactividad media (cpm) de 100 µl de sobrenadante de cultivo en cada pocillo. "B" representa la radiactividad media (cpm) de 100 µl de sobrenadante de cultivo en un pocillo que contiene células diana, 100 µl de solución acuosa NP-40 2 % (Nonidet P-40; Nacalai Tesques) y 50 µl de FBS/D-MEM 10 %. Además, "C" representa la radiactividad media (cpm) de 100 µl de sobrenadante de cultivo en un pocillo que contiene células diana y 150 µl de FBS/D-MEM 10 %. El ensayo se realizó por triplicado. La media y la desviación típica de la velocidad de liberación de cromo específica (%) que refleja la ADCC de cada anticuerpo de ensayo se calcularon basándose en el ensayo descrito anteriormente.

(4) Evaluación de ADCC de cada anticuerpo de ensayo

Se evaluó la ADCC mediada por anticuerpo de ensayo de PBMC humanas. El resultado mostró que todos los anticuerpos ensayados mostraban ADCC. El resultado se muestra en la Figura 57. Se realizó un ensayo de significación en las velocidades de liberación de cromo específicas determinadas para diversas concentraciones de cada anticuerpo de ensayo. El resultado mostró que la velocidad de liberación de cromo específica no era significativamente diferente entre los anticuerpos de ensayo respectivos a cualquier concentración de anticuerpo. Se usó un paquete preclínico de SAS (SAS Institute Inc) para análisis estadístico. Estos resultados mostraron que no hubo ninguna diferencia en ADCC entre los anticuerpos de ensayo respectivos con un punto isoelectrico modificado.

[Ejemplo 28] Preparación de anticuerpo anti receptor de IL-6 humano, anticuerpo anti GPC3 humano y anticuerpo anti receptor de IL-31 humano

1. Preparación de anticuerpo anti receptor de IL-6 humano

Se prepararon dos tipos de anticuerpos anti receptor de IL-6 humano: 6R_a_H1L1 que consistía en 6R_a_H1 (SEQ ID NO: 221) como la cadena pesada y 6R_a_L1 (SEQ ID NO: 224) como la cadena ligera, y 6R_b_H1L1 que consistía en 6R_b_H1 (SEQ ID NO: 227) como la cadena pesada y 6R_b_L1 (SEQ ID NO: 229) como la cadena ligera. Se prepararon vectores de expresión en células animales que codificaban cada secuencia de aminoácidos, y los anticuerpos se expresaron y purificaron por los métodos descritos en los Ejemplos de Referencia 1 y 2.

2. Preparación de anticuerpo anti GPC3 humano

Se preparó un anticuerpo anti GPC3 humano, GPC3_H1L1, que consiste en GPC3_H1 (SEQ ID NO: 233) como la cadena pesada y GPC3_L1 (SEQ ID NO: 236) como la cadena ligera. Se prepararon vectores de expresión de células animales que codificaban cada secuencia de aminoácidos, y el anticuerpo se expresó y purificó por los métodos descritos en los Ejemplos de Referencia 1 y 2.

3. Anticuerpo anti receptor de IL-31 humano

Se preparó un anticuerpo anti receptor de IL-31 humano 31R_H1L1 que consistía en 31R_H1 (SEQ ID NO: 239) como la cadena pesada y 31R_L1 (SEQ ID NO: 242) como la cadena ligera. Se prepararon vectores de expresión de células animales que codificaban cada secuencia de aminoácidos, y el anticuerpo se expresó y purificó por los métodos descritos en los Ejemplos de Referencia 1 y 2.

[Ejemplo 29] Reducción del punto isoelectrico del anticuerpo anti receptor de IL-6 humano, anticuerpo anti GPC3 humano o anticuerpo anti receptor de IL-31 humano mediante sustitución de aminoácidos

1. Búsqueda de secuencias de CDR que reduzcan el punto isoelectrico sin reducción de la actividad de unión a antígeno

El documento WO/2007/114319 describe ejemplos para controlar el punto isoelectrico por sustitución de aminoácidos en CDR, donde se introdujeron sustituciones de aminoácidos en CDR3 de cadena pesada. La CDR3 de cadena pesada está estrechamente asociada con actividad de unión de anticuerpo-antígeno; por lo tanto, se anticipa que para algunos tipos de anticuerpos, el punto isoelectrico no podría reducirse sustituyendo aminoácidos en las mismas posiciones sin reducir la actividad de unión a antígeno. Por lo tanto, los presentes inventores

buscaron secuencias de CDR candidatas que permitieran la reducción del punto isoeléctrico sin reducir la actividad de unión a antígeno independientemente de la especificidad del anticuerpo. Se descubrió que dichas secuencias de CDR candidatas que permitían la reducción del punto isoeléctrico sin reducir la actividad de unión a antígeno incluían H31, H52, H61, H62, H64 y H65 en la región variable de cadena pesada y L24, L27, L27a, L53, L54, L55 y L56 en la región variable de cadena ligera (numeración de Kabat). Después, se introdujeron algunas de las secuencias de CDR candidatas en el anticuerpo anti receptor de IL-6 humano, anticuerpo anti GPC3 humano y anticuerpo anti receptor de IL-31 humano mencionados posteriormente por sustitución de aminoácidos, y los anticuerpos resultantes se ensayaron para evaluar si sus puntos isoeléctricos pueden reducirse sin reducir la actividad de unión a antígeno.

2. Preparación de anticuerpos anti receptor de IL-6 humano con un punto isoeléctrico reducido, evaluación de la actividad de unión y determinación del punto isoeléctrico

Para construir 6R_a_H2 (SEQ ID NO: 222) y 6R_a_L2 (SEQ ID NO: 225), se introdujeron sustituciones de aminoácidos para reducir el punto isoeléctrico y otras sustituciones de aminoácidos en cada uno de 6R_a_H1 (SEQ ID NO: 221) y 6R_a_L1 (SEQ ID NO: 224) que constituían el anticuerpo anti receptor de IL-6 humano 6R_a_H1L1. Después de la construcción del vector, se expresó 6R_a_H2L2 y se purificó por los métodos descritos en los Ejemplos de Referencia 1 y 2. Además, para construir 6R_a_H3 (SEQ ID NO: 223) y 6R_a_L3 (SEQ ID NO: 226), se introdujeron sustituciones de aminoácidos para reducción del punto isoeléctrico y otras sustituciones de aminoácidos en 6R_a_H2L2. Se construyeron vectores por el método descrito en el Ejemplo de Referencia 1 y después se expresó y purificó 6R_a_H3L3.

Las constantes de disociación (KD) de 6R_a_H1L1, 6R_a_H2L2 y 6R_a_H3L3 de su antígeno, el receptor de IL-6 humano, se determinaron por el método basado en Biacore T100 descrito en el Ejemplo de Referencia 3. Las constantes de disociación (KD) de 6R_a_H1L1, 6R_a_H2L2 y 6R_a_H3L3 para el receptor de IL-6 fueron comparables entre sí como se muestra en la Tabla 18 posterior, y las sustituciones de aminoácidos introducidas no redujeron significativamente la actividad de unión a antígeno.

Tabla 18

CONSTANTE DE DISOCIACIÓN (KD)	
6R_a_H1L1	6,70E-11
6R_a_H2L2	3,00E-11
6R_a_H3L3	5,20E-11

El punto isoeléctrico se determinó mediante isoelectroenfoque conocido por los expertos en la materia. El punto isoeléctrico de 6R_a_H1L1 fue de aproximadamente 9,2, mientras que los puntos isoeléctricos de 6R_a_H2L2 y 6R_a_H3L3 que comprendían sustituciones de aminoácidos para reducción del punto isoeléctrico fueron de aproximadamente 6,1 y 5,4, respectivamente. Los puntos isoeléctricos se redujeron en aproximadamente 3,1 y 3,8 en relación con 6R_a_H1L1, respectivamente. Además, el punto isoeléctrico teórico de la región variable VH/VL se calculó usando GENETYX (GENETYX CORPORATION). El punto isoeléctrico teórico de 6R_a_H1L1 fue 9,37, mientras que los de 6R_a_H2L2 y 6R_a_H3L3 fueron 4,63 y aproximadamente 4,27, respectivamente. El punto isoeléctrico teórico se redujo en 4,74 y 5,10 en 6R_a_H2L2 y 6R_a_H3L3 en relación con 6R_a_H1L1, respectivamente. Estos resultados se resumen en la Tabla 19.

Tabla 19

ANTICUERPO ANTI RECEPTOR DE IL-6 HUMANO			
	6R_a_H1L1	6R_a_H2L2	6R_a_H3L3
pI REAL	9,24	6,06	5,44
pI TEÓRICO	9,37	4,63	4,27

Las sustituciones de aminoácidos introducidas en la secuencia de CDR de 6R_a_H1L1 se resumen en la Tabla 20 posterior. Se reveló que estas sustituciones de aminoácidos de CDR podrían reducir el punto isoeléctrico de la molécula 6R_a_H1L1, que es un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano, sin reducir significativamente su actividad de unión a antígeno.

Tabla 20

CLASIFICACIÓN	POSICIÓN MODIFICADA (N.º DE KABAT)	SECUENCIA DE H1	AMINOÁCIDO DESPUÉS DE LA MODIFICACIÓN
CDR1	31	S	D
CDR2	64	K	Q
CDR2	65	S	D

CLASIFICACIÓN	POSICIÓN MODIFICADA (N.º DE KABAT)	SECUENCIA DE L1	AMINOÁCIDO DESPUÉS DE LA MODIFICACIÓN
CDR1	24	R	Q
CDR2	53	R	E
CDR2	55	R	E

A continuación, para construir 6R_b_H2 (SEQ ID NO: 228) y 6R_b_L2 (SEQ ID NO: 230), se introdujeron sustituciones de aminoácidos para reducción del punto isoelectrico y otras sustituciones de aminoácidos en 6R_b_H1 (SEQ ID NO: 227) y 6R_b_L1 (SEQ ID NO: 229) que constituían 6R_b_H1L1, que es otro anticuerpo anti receptor de IL-6 humano. Después de la construcción del vector, se expresó 6R_b_H2L2 y se purificó por los métodos descritos en los Ejemplos de Referencia 1 y 2. Además, para construir 6R_b_L3 (SEQ ID NO: 231) y 6R_b_L4 (SEQ ID NO: 232), se introdujeron sustituciones de aminoácidos para reducción del punto isoelectrico y otras sustituciones de aminoácidos en 6R_b_H2L2. Se construyeron vectores por el método descrito en el Ejemplo de Referencia 1, y después se expresaron y purificaron 6R_b_H2L3 y 6R_b_H2L4.

Se ensayaron 6R_b_H1L1, 6R_b_H2L2, 6R_a_H2L3 y 6R_b_H2L4 usando el método descrito en el Ejemplo de Referencia 4 con respecto a su actividad para neutralizar el antígeno, receptor de IL-6 humano. Como se muestra en la Figura 58, las actividades neutralizantes de 6R_b_H1L1, 6R_b_H2L2, 6R_a_H2L3 y 6R_b_H2L4 fueron comparables entre sí. Las sustituciones de aminoácidos no redujeron significativamente la actividad de unión a antígeno.

El punto isoelectrico se determinó mediante isoelectroenfoque conocido por los expertos en la materia. El punto isoelectrico de 6R_b_H1L1 fue de aproximadamente 9,3, mientras que el punto isoelectrico de 6R_b_H2L2 que comprendía sustituciones de aminoácidos para la reducción de punto isoelectrico fue de aproximadamente 5,9. El punto isoelectrico de 6R_b_H2L2 se redujo en aproximadamente 3,4 en relación con 6R_b_H1L1. Además, el punto isoelectrico teórico de la región variable VH/VL se calculó usando GENETYX (GENETYX CORPORATION). El punto isoelectrico teórico de 6R_b_H1L1 fue de 9,20, mientras que los de 6R_b_H2L2, 6R_b_H2L3 y 6R_b_H2L4 fueron 4,52, aproximadamente 4,46 y aproximadamente 4,37, respectivamente. El punto isoelectrico teórico se redujo en 4,68, 4,74 y 4,83 en 6R_b_H2L2, 6R_b_H2L3 y 6R_b_H2L4 en relación con 6R_b_H1L1, respectivamente. Estos resultados se resumen en la Tabla 21.

Tabla 21

ANTICUERPO ANTI RECEPTOR DE IL-6 HUMANO				
	6R_b_H1L1	6R_b_H2L2	6R_b_H2L3	6R_b_H2L4
pI REAL	9,20	5,94	N.E.	N.E.
pI TEÓRICO	9,20	4,52	4,46	4,37
N.E.: No ensayado				

Las sustituciones de aminoácidos introducidas en la secuencia de CDR de 6R_b_H1L1 se resumen en la Tabla 22 posterior. Se reveló que estas sustituciones de aminoácidos de CDR podrían reducir el punto isoelectrico de la molécula 6R_b_H1L1, que es un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano, sin reducir significativamente su actividad de unión a antígeno.

Tabla 22

CLASIFICACIÓN	POSICIÓN MODIFICADA (N.º DE KABAT)	SECUENCIA DE H1	AMINOÁCIDO DESPUÉS DE LA MODIFICACIÓN
CDR1	31	S	D

CLASIFICACIÓN	POSICIÓN MODIFICADA (N.º DE KABAT)	SECUENCIA DE L1	AMINOÁCIDO DESPUÉS DE LA MODIFICACIÓN
CDR1	24	R	Q
CDR2	53	R	E
CDR2	54	L	E

CLASIFICACIÓN	POSICIÓN MODIFICADA (N.º DE KABAT)	SECUENCIA DE H1	AMINOÁCIDO DESPUÉS DE LA MODIFICACIÓN
CDR2	55	R	E

3. Preparación de anticuerpos anti GPC3 humanos con un punto isoeléctrico reducido, evaluación de la actividad de unión y determinación del punto isoeléctrico

- 5 Para construir GPC3_H2 (SEQ ID NO: 234) y GPC3_L2 (SEQ ID NO: 237), se introdujeron sustituciones de aminoácidos para reducción del punto isoeléctrico y otras sustituciones de aminoácidos en GPC3_H1 (SEQ ID NO: 233) y GPC3_L1 (SEQ ID NO: 236) que constituyen el anticuerpo anti GPC3 humano GPC3_H1L1. Después de la construcción del vector, GPC3_H2L2 se expresó y purificó por los métodos descritos en los Ejemplos de Referencia 1 y 2. Además, para construir GPC3_H3 (SEQ ID NO: 235) y GPC3_L3 (SEQ ID NO: 238), se introdujeron
- 10 sustituciones de aminoácidos para reducción del punto isoeléctrico y otras sustituciones de aminoácidos en GPC3_H2L2. Se construyeron vectores por el método descrito en el Ejemplo de Referencia 1, y después se expresó y purificó GPC3_H3L3.
- 15 GPC3_H1L1, GPC3_H2L2 y GPC3_H3L3 se evaluaron mediante el método de ELISA competitivo descrito en el Ejemplo de Referencia 5 con respecto a su actividad de unión con el antígeno, GPC3 humano. El resultado se muestra en las Figuras 59 y 60. La actividad de unión a glipicano 3 fue comparable entre GPC3-H1L1 y GPC3-H2L2 y entre GPC3-H2L2 y GPC3-H3L3. Las sustituciones de aminoácidos no redujeron significativamente la actividad de unión a antígeno.
- 20 El punto isoeléctrico se determinó mediante isoelectroenfoque conocido por los expertos en la materia. El punto isoeléctrico de GPC3_H1L1 fue de aproximadamente 9,6, mientras que el punto isoeléctrico de GPC3_H2L2 que comprende las sustituciones de aminoácidos para reducción del punto isoeléctrico fue de aproximadamente 8,9. El punto isoeléctrico de GPC3_H2L2 se redujo en 0,7 en relación con GPC3_H1L1. Además, el punto isoeléctrico de GPC3_H2L2 fue de aproximadamente 8,7, mientras que el punto isoeléctrico de GPC3_H3L3 que comprendía
- 25 sustituciones de aminoácidos para reducción del punto isoeléctrico fue de aproximadamente 6,5. El punto isoeléctrico de GPC3_H3L3 se redujo en 2,2 en relación con GPC3_H2L2. Además, el punto isoeléctrico teórico de GPC3_H1L1 fue de 9,65, mientras que el de GPC3_H2L2 fue de 8,47. Por lo tanto, el punto isoeléctrico teórico de GPC3_H2L2 se redujo en 1,18 en relación con GPC3_H1L1. De forma similar, el punto isoeléctrico teórico de GPC3_H2L2 fue de 8,47, mientras que el de GPC3_H3L3 fue de 4,93. El punto isoeléctrico teórico de GPC3_H2L2 se redujo en 3,54 en relación con GPC3_H1L1. Estos resultados se resumen en la Tabla 23.
- 30

Tabla 23		
ANTICUERPO ANTI GPC3 HUMANO		
	H1 L1	H2L2
pI REAL	9,6	8,9
pI TEÓRICO	9,65	8,41
GPC3 ANTI HUMANO ANTICUERPO		
	H2L2	H3L3
pI REAL	8,7	6,5
pI TEÓRICO	8,47	4,93

- 35 Las sustituciones de aminoácidos introducidas en la secuencia de CDR de GPC3_H1L1 se resumen en la Tabla 24 posterior. Se reveló que estas sustituciones de aminoácidos de CDR podrían reducir el punto isoeléctrico de la molécula GPC3_H1L1, que es un anticuerpo anti GPC3 humano, sin reducir significativamente su actividad de unión al antígeno.

Tabla 24			
CLASIFICACIÓN	POSICIÓN MODIFICADA (N.º DE KABAT)	SECUENCIA DE H1	AMINOÁCIDO DESPUÉS DE LA MODIFICACIÓN
CDR2	61	Q	E
CDR2	62	K	S
CDR2	64	K	Q
CDR2	65	G	D
CLASIFICACIÓN	POSICIÓN MODIFICADA (N.º DE KABAT)	SECUENCIA DE L1	AMINOÁCIDO DESPUÉS DE LA MODIFICACIÓN
CDR1	24	R	Q

CLASIFICACIÓN	POSICIÓN MODIFICADA (N.º DE KABAT)	SECUENCIA DE H1	AMINOÁCIDO DESPUÉS DE LA MODIFICACIÓN
CDR1	27	R	Q
CDR1	27	R	E

4. Preparación de anticuerpos anti receptor de IL-31 humano con un punto isoelectrónico reducido, evaluación de la actividad de unión y determinación del punto isoelectrónico

- 5 Para construir 31R_H2 (SEQ ID NO: 240) y 31R_L2 (SEQ ID NO: 243), se introdujeron sustituciones de aminoácidos para reducción del punto isoelectrónico y otras sustituciones de aminoácidos en 31R_H1 (SEQ ID NO: 239) y 31R_L1 (SEQ ID NO: 242) que constituían 31R_H1L1. Después de la construcción del vector, 31R_H2L2 se expresó y se purificó por los métodos descritos en los Ejemplos de Referencia 1 y 2. Además, para construir 31R_H3 (SEQ ID NO: 241), se introdujeron sustituciones de aminoácidos para reducción del punto isoelectrónico y otras sustituciones de aminoácidos en 31R_H2L2. Se construyeron vectores por el método descrito en el Ejemplo de Referencia 1 y después se expresó y purificó 31R_H3L2.

- 15 31R_H2L2 y 31R_H3L2 se evaluaron con respecto a su afinidad de unión por IL-31 por el método basado en Biacore descrito en el Ejemplo de Referencia 6. El resultado se resume en la Tabla 25. Como se muestra en la Tabla 25, las actividades de unión a NR10 de 31R_H2L2 y 31R_H3L2 fueron comparables a las de 31R_H1L1. Por lo tanto, las sustituciones de aminoácidos no redujeron significativamente la actividad de unión a antígeno.

Tabla 25

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
31 R_H1L1	3,7E+05	1,2E-03	3,3E-09
31 R_H2L2	4,2E+05	1,6E-03	3,9E-09
31 R_H3L2	4,4E+05	1,6E-03	3,6E-09

- 20 El punto isoelectrónico se determinó mediante isoelectroenfoque conocido por los expertos en la materia. El punto isoelectrónico de 31R_H1L1 fue de aproximadamente 7,76, mientras que los puntos isoelectrónicos de 31R_H2L2 y 31R_H3L2 que comprendían sustituciones de aminoácidos para reducción del punto isoelectrónico fueron de aproximadamente 5,49 y aproximadamente 5,43, respectivamente. El punto isoelectrónico se redujo en aproximadamente 2,27 y aproximadamente 2,33 en relación con 31R_H1L1, respectivamente. Además, el punto isoelectrónico teórico de 31R_H1L1 fue de aproximadamente 7,76, mientras que los puntos isoelectrónicos teóricos de 31R_H2L2 y 31R_H3L2 fueron de 4,63 y aproximadamente 4,54, respectivamente. Los puntos isoelectrónicos teóricos se redujeron en aproximadamente 3,13 y aproximadamente 3,22 en relación con 31R_H1L1. Estos resultados se resumen en la Tabla 26.

Tabla 26

ANTICUERPO ANTI RECEPTOR DE IL-31 HUMANO			
	H1L1	H2L2	H3L2
pI REAL	7,76	5,49	5,43
pI TEÓRICO	7,76	4,63	4,54

- 30 Las sustituciones de aminoácidos introducidas en la secuencia de CDR de 31R_H1L1 se resumen en la Tabla 27 posterior. Se ha revelado que estas sustituciones de aminoácidos de CDR podrían reducir el punto isoelectrónico de la molécula 31R_H1L1, que es un anticuerpo anti receptor de IL-31 humano, sin reducir significativamente la actividad de unión a antígeno.

Tabla 27

CLASIFICACIÓN	POSICIÓN MODIFICADA (N.º DE KABAT)	SECUENCIA DE H1	AMINOÁCIDO DESPUÉS DE LA MODIFICACIÓN
CDR2	61	Q	D
CDR2	62	K	Q
CDR2	64	K	Q
CDR2	65	G	D

CLASIFICACIÓN	POSICIÓN MODIFICADA (N.º DE KABAT)	SECUENCIA DE L1	AMINOÁCIDO DESPUÉS DE LA MODIFICACIÓN
CDR1	24	R	Q
CDR2	54	L	E

5. Secuencias de CDR que permiten la reducción del punto isoeléctrico de anticuerpo anti receptor de IL-6 humano, anticuerpo anti GPC3 humano o anticuerpo anti receptor de IL-31 humano sin reducir su actividad de unión a antígeno

- 5 Las secuencias de CDR de cadena pesada y cadena ligera de los dos tipos de anticuerpos anti receptor de IL-6 humano (6R_a y 6R_b), anticuerpo anti GPC3 humano (GPC3) y anticuerpo anti receptor de IL-31 humano (31R) preparados como se ha descrito en las secciones de evaluación anteriores se muestran en las Tablas 28 y 29, respectivamente. Se marcan las sustituciones de aminoácidos que redujeron el punto isoeléctrico sin reducir la actividad de unión a antígeno.

10

Tabla 28

CDR	HCDR1	HCDR2	HCDR3
Número	31 32 32a 33 34 35	50 51 52 52a 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65	95 96 97 98 99 100 100a 100b 100c 100d 101 102
6R_a_H1	S D H A W S	Y I S - Y S G I T T Y N P S L K S	V L A R I T A - - M D Y
6R_a_H2	D D H A W S	Y I S - Y S G I T N Y N P S L K G	V L A R I T A - - M D Y
6R_a_H3	D D H A W S	Y I S - Y S G I T N Y N P S L Q D	L L A R A T A - - M D Y
6R_b_H1	S D H A W S	Y I S - Y S G I T T Y N P S L K G	S L A R T T A - - M D Y
6R_b_H2	D D H A W S	Y I S - Y S G I T N Y N P S L K G	S L A R T T A - - M D Y
GPC3_H1	D Y - E M H	A I N P K T G D T A Y S Q K F K G	F Y S Y - - - - - T Y
GPC3_H2	D Y - E M H	A L D P K T G D T A Y S Q K F K G	F Y S Y - - - - - T Y
GPC3_H3	D Y - E M H	A I D P K T G D T A Y S E S F Q D	F Y S Y - - - - - T Y
31R_H1	G Y - I M N	L I N P Y N G G T S Y N Q K F K G	D G Y D D G P Y T M D Y
31R_H2	G Y - I M N	L I N P Y N G G T S Y N Q Q F Q D	D G Y D D G P Y T M D Y
31R_H3	G Y - I M N	L I N P Y N G G T S Y N D Q F Q D	D G Y D D G P Y T M D Y
POSICIÓN EFECTIVA EN MÚLTIPLES ANTICUERPOS	0	00 00	

Tabla 29

CDR	LCDR1																LCDR2								LCDR3							
Número.	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	50	51	52	53	54	55	56	89	90	91	92	93	94	95	96	97
6R_a_L1	R	A	S	Q	D	-	-	-	-	-	I	S	S	Y	L	N	Y	T	S	R	L	H	S	G	Q	G	N	R	L	P	Y	T
6R_a_L2	Q	A	S	Q	D	-	-	-	-	-	I	S	S	Y	L	N	Y	G	S	E	L	H	S	G	Q	G	N	R	L	P	Y	T
6R_a_L3	Q	A	S	E	D	-	-	-	-	-	I	S	S	Y	L	N	Y	G	S	E	L	E	S	G	Q	G	N	R	L	P	Y	T
6R_b_L1	R	A	S	Q	D	-	-	-	-	-	I	S	S	Y	L	N	Y	T	S	R	L	H	S	Q	Q	G	N	T	L	P	Y	T
6R_b_L2	Q	A	S	Q	D	-	-	-	-	-	I	S	S	Y	L	N	Y	G	S	E	L	H	S	Q	Q	G	N	S	L	P	Y	T
6R_b_L3	Q	A	S	Q	D	-	-	-	-	-	I	S	S	Y	L	N	Y	G	S	E	E	H	S	Q	Q	G	N	S	L	P	Y	T
6R_b_L4	Q	A	S	Q	D	-	-	-	-	-	I	S	S	Y	L	N	Y	G	S	E	L	E	S	Q	Q	G	N	S	L	P	Y	T
GPC3_L1	R	A	S	R	S	L	V	H	S	N	R	N	T	Y	L	H	K	V	S	N	R	F	S	S	Q	N	T	H	V	P	P	T
GPC3_L2	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	R	N	T	Y	L	H	K	V	S	N	R	F	S	S	Q	N	T	H	V	P	P	T
GPC3_L3	Q	A	S	E	S	L	V	H	S	N	R	N	T	Y	L	H	K	V	S	N	R	F	S	S	Q	N	T	H	V	P	P	T
31R_L1	R	T	S	E	N	-	-	-	-	-	I	Y	S	F	L	A	N	A	K	T	L	A	K	Q	H	H	Y	E	S	P	L	T
31R_L2	Q	T	S	E	D	-	-	-	-	-	I	Y	S	F	L	A	N	A	Q	T	E	A	Q	Q	H	H	Y	E	S	P	L	T
POSICIÓN EFECTIVA EN MÚLTIPLES ANTICUERPOS	O O																O O O															

15

El resultado anterior demuestra que las posiciones H31, H61, H62, H64 y H65 en la región variable de cadena pesada y las posiciones L24, L27, L53, L54 y L55 en la región variable de cadena ligera (numeración de Kabat) son posiciones de CDR comunes, independientemente de la especificidad de anticuerpo, donde pueden introducirse sustituciones de aminoácidos para reducir el punto isoeléctrico del anticuerpo sin reducir significativamente la actividad de unión a antígeno.

20

El documento WO/2007/114319 describe que la farmacocinética de IgG puede mejorarse reduciendo el punto isoeléctrico del anticuerpo. En el documento WO/2007/114319, se sustituyeron aminoácidos principalmente en el

marco conservado de anticuerpo de región variable de anticuerpo para evitar la reducción de la actividad de unión a antígeno. Los cambios en los puntos isoeléctricos medidos y teóricos de anticuerpo anti Factor IXa fueron de aproximadamente 0,9 y 1,0, respectivamente. Los cambios en los puntos isoeléctricos medidos y teóricos de anticuerpo anti Factor X fueron de aproximadamente 0,5 y 0,1, respectivamente. Los cambios de punto isoeléctrico fueron pequeños.

En la presente invención, se descubrieron secuencias de CDR que no dieron como resultado reducción de la actividad de unión de anticuerpo-antígeno, y pueden introducirse sustituciones de aminoácidos no solamente en el marco conservado de región variable sino también en la CDR de anticuerpo para reducir el punto isoeléctrico. Como resultado, los puntos isoeléctricos medidos y teóricos se redujeron en aproximadamente 3,8 y aproximadamente 5,1, respectivamente, en el anticuerpo anti receptor de IL-6 humano descrito anteriormente; los puntos isoeléctricos medidos y teóricos se redujeron en aproximadamente 3,1 y aproximadamente 4,7, respectivamente, en el anticuerpo anti GPC3 humano; y los puntos isoeléctricos medidos y teóricos se redujeron en aproximadamente 3,2 y aproximadamente 2,3, respectivamente, en el anticuerpo anti receptor de IL-31 humano. La presente invención reveló que las sustituciones de aminoácidos en la CDR podrían dar como resultado reducción significativa del punto isoeléctrico en comparación con sustituciones de aminoácidos en el marco conservado solo.

[Ejemplo 30] Evaluación de farmacocinética de anticuerpos anti receptor de IL-6 humano, anticuerpos anti GPC3 humano y anticuerpos anti receptor de IL-31 humano con un punto isoeléctrico reducido

1. Evaluación de anticuerpos anti receptor de IL-6 humano con respecto a su farmacocinética en monos cinomolgus y ratones

6R_a_H1L1, un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano, y 6R_a_H2L2 y 6R_a_H3L3, anticuerpos anti receptor de IL-6 humano con un punto isoeléctrico reducido, se evaluaron con respecto a su farmacocinética en monos cinomolgus. 6R_a_H1L1 o 6R_a_H2L2 se administró por vía intravenosa una vez a 1,0 mg/kg. Se recogió sangre a lo largo del tiempo antes y después de la administración. Además, 6R_a_H2L2 o 6R_a_H3L3 se administró por vía subcutánea una vez a 1,0 mg/kg. Se recogió sangre a lo largo del tiempo antes y después de la administración.

Las concentraciones en plasma se midieron por ELISA. Se separaron en alícuotas concentraciones apropiadas de muestras convencionales y muestras de plasma de ensayo en pocillos de inmunoplasmas (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp (Nalge Nunc International)) recubiertas con F(ab')₂ anti IgG humano (específico de cadena γ) (Sigma). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante una hora, y después se hicieron reaccionar posteriormente anti IgG humano de cabra-BIOT (Southern Biotechnology Associates) y conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics). Después del desarrollo del color usando el Sistema de Sustratos de fosfatasa BluePhos Microwell (Kirkegaard & Perry Laboratories) como un sustrato, se midió la absorbancia a 650 nm con un lector de microplacas. Las concentraciones en plasma se determinaron basándose en la absorbancia de la curva de calibración usando el software analítico SoftMax Pro (Molecular Devices). Los datos de concentración en plasma-tiempo obtenidos se evaluaron mediante análisis sin modelo usando el software de análisis farmacocinético WinNonlin (Pharsight) para estimar la eliminación (CL). El resultado se muestra en la Tabla 30. Cuando se administra por vía intravenosa, 6R_a_H2L2, que tiene un punto isoeléctrico reducido, mostró eliminación más lenta que 6R_a_H1L1. Esto sugiere que la farmacocinética se mejora reduciendo el punto isoeléctrico. Además, cuando se administra por vía subcutánea, 6R_a_H3L3, que tiene un punto isoeléctrico reducido, mostró eliminación más lenta que 6R_a_H2L2. Esto sugiere que la farmacocinética se mejora reduciendo el punto isoeléctrico.

Tabla 30

	CL (ml/h/kg)
6R_a_H1L1 iv	1,82
6R_a_H2L2 iv	0,91
6R_a_H2L2 sc	1,43
6R_a_H3L3 sc	0,93

A continuación, 6R_b_H1L1, que es otro anticuerpo anti receptor de IL-6 humano, y 6R_b_H2L2, un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano con un punto isoeléctrico reducido, se evaluaron con respecto a su farmacocinética en ratones (C57BL/6J; Charles River Japan, Inc.). 6R_b_H1L1 o 6R_b_H2L2 se administró por vía intravenosa una vez a 1,0 mg/kg. Se recogió sangre a lo largo del tiempo antes y después de la administración. Además, 6R_b_H1L1 o 6R_b_H2L2 se administró por vía subcutánea una vez a 1,0 mg/kg. Se recogió sangre a lo largo del tiempo antes y después de la administración.

Las concentraciones en plasma se midieron mediante ELISA. En primer lugar, se biotiniló sR de IL-6 humano recombinante (R&D Systems) usando Kit de Sulfo-NHS-biotinilación EZ-Link™ (Pierce). El sIL-6R humano biotinilado se separó en alícuotas en pocillos de placas recubiertas con Alta Capacidad de Unión (HBC) de Estreptavidina Reacti-Bind (Pierce), y se incubó a temperatura ambiente durante una hora o más para preparar placas con sIL-6R humano inmovilizado. Se prepararon concentraciones apropiadas de muestras patrón y muestras de plasma de

ensayo de ratón y se separaron en alícuotas en pocillos de las placas con sIL-6R humano inmovilizado. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante una hora, y después se hicieron reaccionar con IgG anti humano-AP (Sigma). Después del desarrollo del color usando el Sistema de Sustratos de Fosfatasa BluePhos Microwell (Kirkegaard & Perry Laboratories) como un sustrato, se midió la absorbancia a 650 nm con un lector de microplacas. Las concentraciones en plasma se determinaron basándose en la absorbancia de la curva de calibración usando el software analítico SoftMax Pro (Molecular Devices). Los datos de concentración en plasma-tiempo obtenidos se evaluaron mediante análisis sin modelo usando el software de análisis farmacocinético WinNonlin (Pharsight) para estimar la eliminación (CL). El resultado se muestra en la Tabla 31. En cada caso de administración intravenosa y administración subcutánea, 6R_a_H2L2, que tiene un punto isoelectrico reducido, mostró eliminación más lenta que 6R_a_H1L1. Esto sugiere que la farmacocinética puede mejorarse reduciendo el punto isoelectrico.

Tabla 31

	CL (ml/h/kg)
6R_b_H1L1 iv	0,18
6R_b_H2L2 iv	0,10
6R_b_H1L1 sc	0,18
6R_b_H2L2 sc	0,09

2. Evaluación de anticuerpos anti GPC3 humano con respecto a su farmacocinética en ratones

Se evaluaron GPC3_H1L1, un anticuerpo anti GPC3 humano, y GPC3_H2L2 y GPC3_H3L3, anticuerpos anti GPC3 humano con un punto isoelectrico reducido, con respecto a su farmacocinética en ratones C.B-17/lcr scid. GPC3_H1L1, GPC3_H2L2 o GPC3_H3L3 se administró por vía intravenosa una vez a 5,0 mg/kg. Se recogió sangre a lo largo del tiempo antes y después de la administración.

Las concentraciones en plasma se midieron mediante ELISA. Las concentraciones apropiadas de muestras convencionales, y muestras de ensayo de plasma de ratón apropiadamente diluido a concentraciones deseadas se separaron en alícuotas en pocillos de inmunoplasmas (Nunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge Nunc International)) con el antígeno GPC3 inmovilizado (Chugai Pharmaceutical Co. Ltd.). Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora, y después se separaron en alícuotas Anti IgG Humano de Cabra-BIOT (Southern Biotechnology Associates) y conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics) sucesivamente. Después del desarrollo del color usando el Sistema de Sustratos de Fosfatasa BluePhos Microwell (Kirkegaard & Perry Laboratories) como sustrato, se midió la absorbancia a 650 nm con un lector de microplacas. Las concentraciones en plasma se determinaron basándose en la absorbancia de la curva de calibración usando el software analítico SoftMax Pro (Molecular Devices). Los datos de concentración en plasma-tiempo obtenidos se evaluaron mediante análisis sin modelo usando el software de análisis farmacocinético WinNonlin (Pharsight) para estimar la eliminación (CL). El resultado se muestra en la Tabla 32. GPC3_H2L2, que tiene un punto isoelectrico reducido, mostró eliminación más lenta que GPC3_H1L1. Además, GPC3_H3L3, que tiene un punto isoelectrico más reducido, mostró eliminación más lenta que GPC3_H2L2. Esto sugiere que la farmacocinética puede mejorarse reduciendo el punto isoelectrico.

Tabla 32

	CL(ml/h/kg)
GPC3_H1L1	2,34
GPC3_H2L2	0,38
GPC3_H3L3	0,22

3. Evaluación de anticuerpos anti receptor de IL-31 humano con respecto a su farmacocinética en ratones

31R_H1L1, un anticuerpo anti receptor de IL-31 humano, y 31R_H2L2, un anticuerpo anti receptor de IL-31 humano con un punto isoelectrico reducido, se evaluaron con respecto a su farmacocinética en ratones (C57BL/6J; Charles River Japan, Inc.). 31R_H1L1 o 31R_H2L2 se administró por vía intravenosa una vez a 1,0 mg/kg. Se recogió sangre a lo largo del tiempo antes y después de la administración.

Las concentraciones en plasma se midieron por ELISA. Se separaron en alícuotas concentraciones apropiadas de muestras patrón y muestras de plasma de ensayo en pocillos de inmunoplasmas (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp (Nalge Nunc International)) con anticuerpo anti IgG humano (especifico de Fc) inmovilizado (Sigma). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Se hizo reaccionar Anti IgG Humano de Cabra-ALP (Sigma) a temperatura ambiente durante una hora. Después del desarrollo del color usando el Sistema de Sustratos de Fosfatasa BluePhos Microwell (Kirkegaard & Perry Laboratories) como un sustrato, se midió la absorbancia a 650 nm con un lector de microplacas. Las concentraciones en plasma se determinaron basándose en la absorbancia de

la curva de calibración usando el software analítico SoftMax Pro (Molecular Devices).

Los datos de concentración en plasma-tiempo obtenidos se evaluaron mediante análisis sin modelo usando el software de análisis de farmacocinética WinNonlin (Pharsight) para estimar la eliminación (CL). El resultado se muestra en la Tabla 33. 31R_H2L2, que tiene un punto isoeléctrico reducido, mostró eliminación más lenta que 31R_H1L1. Esto sugiere que la velocidad de eliminación se disminuye reduciendo el punto isoeléctrico.

Tabla 33

	CL(ml/h/kg)
31R_H1L1	0,15
31 R H2L2	0,13

3. Conclusiones

La presente invención reveló que la farmacocinética de diversos anticuerpos contra diferentes antígenos puede mejorarse reduciendo sus puntos isoeléctricos sin reducir la actividad de unión anticuerpo-antígeno mediante sustitución de aminoácidos en la secuencia de CDR. Se ha mostrado que entre las sustituciones de aminoácidos en la secuencia de CDR, las de las posiciones H31, H61, H62, H64 y H65 en la región variable de cadena pesada, y las de las posiciones L24, L27, L53, L54 y L55 en la región variable de cadena ligera (numeración de Kabat) son sustituciones de aminoácidos que pueden introducirse para reducir el punto isoeléctrico de anticuerpo sin reducir significativamente la actividad de unión a antígeno, y por lo tanto pueden mejorar la farmacocinética de anticuerpo independientemente de la especificidad de anticuerpo. Estas posiciones de mutación en la secuencia de CDR se consideran útiles como posiciones para sustitución de aminoácidos para mejorar la farmacocinética de anticuerpo independientemente de la especificidad de anticuerpo, ya que las sustituciones de aminoácidos en estas posiciones pueden reducir el punto isoeléctrico del anticuerpo sin reducir significativamente la actividad de unión anticuerpo-antígeno.

[Ejemplo 31] Separación de picos de homodímeros y heterodímeros de anticuerpo anti receptor de IL-6 humano, anticuerpo anti GPC3 humano o anticuerpo anti receptor de IL-31 humano con un punto isoeléctrico reducido por cromatografía convencional

1. Expresión de heterodímero del anticuerpo anti Factor IX/anticuerpo anti Factor X

El documento de patente WO/2007/114325 ha presentado métodos para purificar anticuerpos biespecíficos de tipo IgG que tienen una cadena L común. Para expresar anticuerpos biespecíficos de tipo IgG que tienen una cadena L común, es necesario expresar dos tipos de cadenas pesadas (cadena A y cadena B) y una cadena ligera común. En este caso, se expresan no solamente heterodímeros de cadena A-cadena B, que es el anticuerpo biespecífico de interés, sino también homodímero de cadena A y homodímero de cadena B; por lo tanto, el anticuerpo biespecífico de interés, heterodímero de cadena A-cadena B, tiene que purificarse a partir de la mezcla de tres tipos de anticuerpos. Este documento de patente también describe que los métodos convencionales no fueron capaces de purificar heterodímero de cadena A-cadena B separando el pico de heterodímero de cadena A-cadena B de los picos de homodímeros de cadena A y cadena B por cromatografía convencional, pero el heterodímero de cadena A-cadena B puede purificarse separando los picos del heterodímero de cadena A-cadena B y homodímeros de cadena A y cadena B por cromatografía de intercambio catiónico convencional cuando la diferencia entre los puntos isoeléctricos de los homodímeros de cadena A y cadena B se aumentó sustituyendo aminoácidos en las regiones variables de los dos tipos de cadenas pesadas, concretamente cadena A y cadena B. En esta patente, se sustituyeron aminoácidos en el marco conservado solamente, porque se consideró que las sustituciones de aminoácidos en la CDR de región variable afectaban a la actividad de unión de anticuerpo-antígeno. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, las sustituciones de aminoácidos en el marco conservado no provocan cambios significativos en el punto isoeléctrico. Por lo tanto, para conseguir purificación eficaz del heterodímero de cadena A-cadena B, se prefiere aumentar adicionalmente la diferencia entre los puntos isoeléctricos de homodímeros de cadena A y cadena B. En este contexto, se ensayó si los picos del heterodímero de cadena A-cadena B, homodímero de cadena A y homodímero de cadena B podrían separarse introduciendo las sustituciones de aminoácidos de CDR en el Ejemplo 28 que reducen el punto isoeléctrico de anticuerpo sin reducir significativamente la actividad de unión de anticuerpo-antígeno.

2. Expresión de heterodímero de anticuerpo anti receptor de IL-6 humano/anticuerpo anti receptor de IL-6 humano con un punto isoeléctrico reducido

Se expresó 6R_a_H1H3L3 (mezcla de heterodímero de cadena A-cadena B (6R_a_H1/H3/L3), un homodímero de cadena A (6R_a_H1/L3), y homodímero de cadena B (6R_a_H3/L3)) y se purificó por el método descrito en el Ejemplo de Referencia 2 usando 6R_a_L3 (SEQ ID NO: 226) como una cadena ligera común, 6R_a_H1 (SEQ ID NO: 221) como una cadena A y 6R_a_H3 (SEQ ID NO: 223) como una cadena B cuyo punto isoeléctrico se había reducido sin reducir la actividad de unión a antígeno para aumentar la diferencia en el punto isoeléctrico en

comparación con la cadena A.

3. Expresión de heterodímero de anticuerpo anti GPC3 humano/anticuerpo anti GPC3 humano con un punto isoeléctrico reducido

Se expresó GPC3_H2H3L3 (mezcla de heterodímero de cadena A-cadena B (GPC3_H2/H3/L3), homodímero de cadena A (GPC3_H2/L3) y homodímero de cadena B (GPC3_H3/L3)) y se purificó por el método descrito en el Ejemplo de Referencia 2 usando GPC3_L3 (SEQ ID NO: 238) como una cadena ligera común, GPC3_H2 (SEQ ID NO: 234) como una cadena A y GPC3_H3 (SEQ ID NO: 235) como una cadena B cuyo punto isoeléctrico se había reducido sin reducción de la actividad de unión a antígeno para aumentar la diferencia en el punto isoeléctrico en comparación con la cadena A.

4. Expresión de heterodímero de anticuerpo anti receptor de IL-31 humano/anticuerpo anti receptor de IL-31 humano con un punto isoeléctrico reducido

Se expresó 31R_H1aH2aL2 (mezcla de heterodímero de cadena A-cadena B (31R_H1a/H2a/L2), homodímero de cadena A (31R_H1a/L2) y homodímero de cadena B (31R_H2a/L2)) y se purificó por el método descrito en el Ejemplo de Referencia 2 usando 31R_L2 (SEQ ID NO: 243) como una cadena ligera común y como una cadena A 31R_H1a (SEQ ID NO: 244) que se obtuvo modificando la región constante de 31R_H1 y 31R_H2a (SEQ ID NO: 245) como una cadena B que se obtuvo modificando la región constante de 31R_H2 cuyo punto isoeléctrico se había reducido sin reducción de la actividad de unión a antígeno para aumentar la diferencia en el punto isoeléctrico en comparación con la cadena A.

5. Evaluación de anticuerpo expresado mediante cromatografía de intercambio catiónico

Las diferencias en el punto isoeléctrico de VH/VL teórico entre homodímeros de cadena A y cadena B de anticuerpos preparados como se ha descrito anteriormente se resumen en la Tabla 34. Introduciendo no solamente en el marco conservado de cadena pesada sino también en la secuencia de CDR de cadena pesada, sustituciones de aminoácidos que reducen el punto isoeléctrico sin pérdida de actividad de unión, la diferencia en el punto isoeléctrico teórico puede aumentarse hasta 1,56 entre homodímeros de cadena A y cadena B. El documento de patente WO/2007/114325 ha indicado que la diferencia en el punto isoeléctrico de VH/VL teórico entre homodímeros de cadena A y cadena B puede aumentarse hasta 1,13 reduciendo el punto isoeléctrico del homodímero de cadena A mediante sustitución de aminoácidos en su marco conservado solamente y aumentando simultáneamente el punto isoeléctrico del homodímero de cadena B mediante sustitución de aminoácidos en su marco conservado solamente. El resultado de la evaluación descrita en el presente documento muestra que la diferencia en el punto isoeléctrico teórico puede aumentarse hasta 1,56 introduciendo sustituciones de aminoácidos en no solamente el marco conservado sino también en la secuencia de CDR incluso cuando solamente se introducen sustituciones de aminoácidos en una cadena (es decir, solamente se reduce el punto isoeléctrico de una cadena). Específicamente, la presente invención ha demostrado que para separar homodímeros de cadena A y cadena B, la diferencia en el punto isoeléctrico entre los dos tipos de homodímeros podría aumentarse adicionalmente introduciendo sustituciones de aminoácidos no solamente en el marco conservado sino también en la secuencia de CDR sin pérdida de la actividad de unión. En general, la separación mediante cromatografía de intercambio iónico convencional depende de la diferencia en el punto isoeléctrico entre los dos componentes para separar. Por lo tanto, las sustituciones descritas anteriormente permiten la separación fácil de los dos componentes.

Tabla 34

NOMBRE DE LA MOLÉCULA		pi TEÓRICO DE VH/VL	DIFERENCIA DE pi TEÓRICO
HOMODÍMERO DE CADENA A	6a_H1_L3	4,86	0,59
HOMODÍMERO DE CADENA B	6a_H3_L3	4,27	
HOMODÍMERO DE CADENA A	GPC3_H2_L3	6,49	1,56
HOMODÍMERO DE CADENA B	GPC3_H3_L3	4,93	
HOMODÍMERO DE CADENA A	31R_H1_L2	5,06	0,43
HOMODÍMERO DE CADENA B	31R_H2_L2	4,63	

6R_a_H1H3L3, GPC3_H2H3L3 y 31R_H1aH2aL2 se ensayaron para evaluar si pueden separarse individualmente como picos de heterodímero de cadena A-cadena B, homodímero de cadena A y homodímero de cadena B mediante cromatografía de intercambio catiónico. ProPac WCX-10 (Dionex) se usó como una columna de cromatografía de intercambio catiónico convencional. La cromatografía se llevó a cabo con un caudal y gradiente apropiados usando MES 25 (pH 5,0) como fase móvil A y MES 25 mM que contenía NaCl 1 M (pH 5,0) como fase

móvil B. El resultado de la evaluación mediante cromatografía de intercambio catiónico se muestra en la Figura 61. Se demostró que todos los 6R_a_H1H3L3, GPC3_H2H3L3 y 31R_H1aH2aL2 se separaban en picos de heterodímero de cadena A-cadena B, homodímero de cadena A y homodímero de cadena B.

Independientemente de la especificidad de anticuerpo, las sustituciones de aminoácidos en posiciones de H31, H61, H62, H64 y H65 (numeración de Kabat) en la región variable de cadena pesada pueden reducir el punto isoeléctrico de anticuerpo sin reducir significativamente la actividad de unión de anticuerpo-antígeno. Se reveló por lo tanto que las sustituciones de aminoácidos permitían la separación del heterodímero y los homodímeros mediante cromatografía de intercambio catiónico. Las mutaciones en estas posiciones en la secuencia de CDR pueden reducir el punto isoeléctrico de anticuerpo sin reducir significativamente la actividad de unión de anticuerpo-antígeno independientemente de la especificidad de anticuerpo. Por lo tanto, las posiciones son útiles como posiciones para sustitución de aminoácidos para aumentar la diferencia en el punto isoeléctrico entre los heterodímeros y homodímeros del anticuerpo biespecífico.

[Ejemplo de Referencia 1] Construcción de vectores de expresión de anticuerpos

Cada mutante se construyó usando el kit de Mutagénesis Dirigida QuikChange (Stratagene) o mediante PCR de ensamblaje. Cuando se usó el Kit de Mutagénesis Dirigida QuikChange (Stratagene), se construyeron mutantes mediante el método descrito en el protocolo adjunto. Como alternativa, se llevó a cabo PCR de ensamblaje usando uno de los métodos descritos posteriormente. En el primer método, se sintetizaron oligo ADN basándose en secuencias directas e inversas incluyendo sitios de modificación. Se construyeron dos fragmentos, concretamente fragmentos 5' y 3', incluyendo sitios de modificación mediante PCR usando PrimeSTAR (Takara), y combinaciones de oligo ADN directo incluyendo sitio de modificación y oligo ADN inverso que se unía con el vector que portaba el gen para modificar, y oligo ADN inverso que incluía un sitio de modificación y oligo ADN directo que se unía con el vector que portaba el gen para modificar. Cada mutante se construyó uniendo los dos fragmentos mediante PCR de ensamblaje. En el segundo método, se preparó un número apropiado de oligo ADN para abarcar la región variable completa. La región variable completa se construyó uniendo los oligo ADN mediante PCR de ensamblaje. Los mutantes construidos por los métodos descritos anteriormente se insertaron en vectores de expresión capaces de expresar genes insertados en células animales. Las secuencias de nucleótidos de los vectores de expresión obtenidos se determinaron mediante un método conocido para los expertos en la materia.

[Ejemplo de Referencia 2] Expresión y purificación de anticuerpos

Se expresaron anticuerpos mediante el método descrito posteriormente. Se suspendieron células de la línea de carcinoma renal fetal humano HEK293H (Invitrogen) a una densidad de 5×10^5 a 6×10^5 células/ml en DMEM (Invitrogen) complementado con FBS 10 % (Invitrogen), y se sembraron en placas celulares de adhesión (diámetro de 10 cm; Corning) a 10 ml/placa. Las células se cultivaron en un incubador de CO₂ (37 °C, CO₂ 5 %) durante un día y una noche completos. Después, el medio se retiró por aspiración y se añadieron 6,9 ml de medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen) a la placa. Los plásmidos preparados se introdujeron en células mediante lipofección. Los sobrenadantes obtenidos después de cultivarse se recogieron, y después las células se retiraron mediante centrifugación (a temperatura ambiente y aproximadamente 2000 g durante cinco minutos). Los sobrenadantes de cultivo se esterilizaron por filtración con un filtro de 0,22 µm MILLEX (R)-GV (Millipore). Los anticuerpos se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo resultantes usando rProteína A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences) mediante un método conocido por los expertos en la materia. Las concentraciones de anticuerpos purificados se determinaron a partir de la absorbancia a 280 nm medida con un espectrofotómetro. Las concentraciones de anticuerpo se calcularon a partir de los valores determinados usando coeficiente de extinción determinado por el método de PACE (Protein Science (1995) 4: 2411-2423).

[Ejemplo de Referencia 3] Método basado en Biacore para evaluar la afinidad de anticuerpo anti receptor de IL-6 humano por el receptor de IL-6

1. Preparación de receptor de IL-6 humano soluble

Se preparó receptor de IL-6 humano recombinante, que es el antígeno, por el método descrito posteriormente. Se preparó una línea celular CHO que expresaba de forma constitutiva la secuencia de los aminoácidos 1 a 344 N terminales del receptor de IL-6 humano soluble (Yamasaki *et al*, Science (1988) 241: 825-828 (GenBank n.º X12830)) presentado en J. Biochem. (1990) 108: 673-676. El receptor de IL-6 humano soluble se purificó a partir del sobrenadante de cultivo de células CHO que expresaban receptor de IL-6 humano soluble usando tres tipos de cromatografía en columna: cromatografía en columna Blue Sepharose 6 FF, cromatografía de afinidad en una columna con un anticuerpo específico de receptor de IL-6 humano soluble inmovilizado, y cromatografía en columna de filtración en gel. La fracción eluida como el pico principal se usó como la muestra purificada final.

2. Evaluación basada en Biacore de la afinidad por el receptor de IL-6 humano soluble

La cinética de reacción de antígeno-anticuerpo entre el anticuerpo anti receptor de IL-6 y el receptor de IL-6 humano soluble se analizó usando Biacore T100 (GE Healthcare Biosciences). La interacción de antígeno-anticuerpo se

medió inmovilizando rec-Proteína A (Zymed) (en lo sucesivo en el presente documento "Proteína A") en una microplaca sensora, capturando un anticuerpo con la proteína A inmovilizada y después haciendo reaccionar el anticuerpo con el antígeno como un analito usando un método conocido por los expertos en la materia. El tampón de ejecución usado fue HBS-EP+, y el caudal fue de 20 µl/min. Cada anticuerpo se preparó de modo que se unieran aproximadamente 100 UR del anticuerpo a Proteína A/G. Se preparó receptor de IL-6 humano soluble a 0, 0,065, 0,131 y 0,261 µg/ml usando HBS-EP+ y se usó como un analito. En la primera etapa de la medición, el anticuerpo en solución se unió a Proteína A/G, y se permitió que la solución de analito interaccionara con el anticuerpo. Después de tres minutos de interacción, la solución se cambió a HBS-EP+, y la fase de disociación se supervisó durante 10 o 15 minutos. Después de la medición de la fase de disociación, se regeneró la microplaca sensora lavando con 10 µl de glicina-HCl 10 mM (pH 1,5). La asociación, disociación y regeneración constituyen un ciclo de análisis. Cada anticuerpo se midió de acuerdo con este ciclo. Los sensogramas obtenidos se analizaron cinéticamente usando el software de análisis de datos específico de Biacore, Software de Evaluación Biacore T100 (GE Healthcare Biosciences).

[Ejemplo de Referencia 4] Método para evaluar la actividad neutralizante del receptor de IL-6 de anticuerpo anti receptor de IL-6 humano usando células BaF/6R

Para obtener una línea celular que prolifera de una manera dependiente de IL-6, se estableció una línea celular BaF3 que expresaba gp130 humano e IL-6R humano mediante el procedimiento descrito posteriormente. El ADNc de IL-6R humano de longitud completa se amplificó mediante PCR y se clonó en pcDNA3.1(+) (Invitrogen) para construir hIL-6R/pcDNA3.1(+). Se introdujo pCOS2Zeo/gp130 en células BaF3 por electroporación. Se estableció una línea celular BaF3 que expresaba gp130 humano (en lo sucesivo en el presente documento "BaF/gp130") mediante selección en presencia de interleucina 6 humana (R&D Systems) y receptor soluble de interleucina 6 humana 100 ng/ml (R&D Systems). A continuación, se amplificó el ADNc de IL-6R humano de longitud completa mediante PCR y se clonó en pcDNA3.1(+) (Invitrogen) para construir hIL-6R/pcDNA3.1(+). Mediante electroporación, se introdujo pcDNA3.1(+)/hIL-6R en la célula BaF/gp130 preparada como se ha descrito anteriormente. Se estableció una línea celular BaF3 que expresaba IL-6R humano (en lo sucesivo en el presente documento "BaF/6R") mediante selección en presencia de interleucina 6 humana (R&D Systems). Ya que BaF/6R prolifera en presencia de interleucina 6 humana (R&D Systems), se puede usar para evaluar la actividad de inhibición del crecimiento de un anticuerpo anti receptor de IL-6 humano (concretamente, la actividad neutralizante del receptor de IL-6 humano).

El anticuerpo anti receptor de IL-6 humano se evaluó con respecto a su actividad neutralizante de receptor de IL-6 humano usando BaF/6R. Después de lavar tres veces con RPMI 1640 complementado con FBS 10 %, BaF/6R se suspendió a $2,5 \times 10^4$ hasta $5,0 \times 10^4$ células/ml en RPMI 1640 que contenía FBS 10 % e interleucina 6 humana 20 ng/ml (Toray) (a una concentración final de 10 ng/ml) y se separó en alícuotas (50 µl) en cada pocillo de placas de 96 pocillos (Corning). Después, el anticuerpo anti receptor de IL-6 humano se diluyó con RPMI 1640 que contenía FBS 10 % y se añadió a cada pocillo (50 µl/pocillo). Las células se cultivaron a 37 °C con CO₂ 5 % durante tres días. Se diluyó Reactivo WST-8 (Kit de Recuento Celular 8; Dojindo Laboratories) dos veces con PBS. Inmediatamente después se añadieron 20 µl del reactivo a cada pocillo, se midió la absorbancia a 450 nm (longitud de onda de referencia: 620 nm) usando SUNRISE CLASSIC (TECAN). Después de cultivar durante dos horas, se midió de nuevo la absorbancia a 450 nm (longitud de onda de referencia: 620 nm). La actividad neutralizante del receptor de IL-6 humano se evaluó usando el cambio de absorbancia durante dos a cuatro horas como un indicador.

[Ejemplo de Referencia 5] Evaluación de anticuerpos anti GPC3 humano modificados con respecto a su actividad de unión mediante ELISA competitivo.

Las actividades de unión de anticuerpos preparados se determinaron mediante ELISA competitivo. El polipéptido de núcleo GPC3 soluble (SEQ ID NO: 207) preparado a 1 µg/ml se añadió a placas de 96 pocillos (100 µl/pocillo). Las placas se incubaron a 4 °C durante una noche para inmovilizar el polipéptido de núcleo GPC3 soluble en las placas. Después de lavar las placas con el polipéptido de núcleo GPC3 soluble inmovilizado tres veces con tampón de lavado usando SkanWasher 400 (Molecular Devices), se añadieron al mismo 200 µl de tampón de bloqueo. Las placas se incubaron a 4 °C durante 30 minutos o más para bloqueo. Las placas con el polipéptido de núcleo GPC3 soluble inmovilizado y bloqueadas se lavaron tres veces con tampón de lavado usando SkanWasher 400. Después, se combinaron 100 µl de diversas concentraciones de anticuerpo GPC3-H2L2 o un anticuerpo diferente con 100 µl de anticuerpo biotinilado GPC3-H2L2 a una concentración final de 0,3 µg/ml, y las mezclas resultantes se añadieron a los pocillos (200 µl/pocillo). El anticuerpo GPC3-H2L2 se biotiniló usando un kit de marcaje de biotina (Roche) de acuerdo con el protocolo adjunto. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora, y después se lavaron cinco veces con tampón de lavado usando SkanWasher 400 (Molecular Devices). Se añadieron a cada pocillo 100 µl de fosfatasa alcalina anti estreptavidina de cabra (Zymed) 20.000 veces diluida con tampón de sustrato. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora, y después se lavaron cinco veces con tampón de lavado usando SkanWasher 400. Se preparó sustrato de fosfatasa (Sigma) a 1 mg/ml usando tampón de sustrato y se añadió a cada pocillo (100 µl). Las placas se incubaron durante una hora. La absorbancia de la mezcla de reacción en cada pocillo se midió a 405 nm con absorbancia de referencia a 655 nm usando Benchmark Plus (Bio-Rad).

[Ejemplo de Referencia 6] Método basado en Biacore para evaluar la afinidad de anticuerpo anti receptor de IL-31 humano por el receptor de IL-31

1. Preparación de receptor de IL-31 humano soluble

El dominio extracelular del receptor de IL-31 humano se amplificó mediante PCR usando ADNc de receptor de IL-31 humano como un molde. Después de unir una secuencia marcadora de FLAG al extremo C terminal, el producto de PCR se insertó en un vector de expresión de células de mamífero. Se introdujeron 10 µg del vector linealizado en la línea celular de ovario de hámster chino DG44 mediante electroporación (Bio-Rad Gene Pulser II; 25 µF, 1,5 kV). Se obtuvo una línea celular que mostraba alto nivel de expresión. La línea celular se cultivó a gran escala. Se purificó NR10 soluble a partir del sobrenadante del cultivo usando columna de anticuerpo anti FLAG (Sigma) y filtración en gel. La secuencia de aminoácidos del receptor de IL-31 humano soluble se muestra en SEQ ID NO: 246.

2. Evaluación basada en Biacore de la afinidad por el receptor de IL-31 humano soluble

Se analizó la cinética de reacción de antígeno-anticuerpo entre anticuerpo anti receptor de IL-31 humano y receptor de IL-31 soluble usando Biacore T100 (GE Healthcare Biosciences). La interacción de antígeno-anticuerpo se midió inmovilizando rec-Proteína A (Zymed) (en lo sucesivo en el presente documento "Protein A") en una microplaca sensora, capturando un anticuerpo con la Proteína A inmovilizada y haciendo después reaccionar el anticuerpo con el antígeno como un analito usando un método conocido por los expertos en la materia. Cada anticuerpo se preparó de modo que se unió una cantidad apropiada del anticuerpo con Proteína A/G. Se preparó receptor IL-31 humano soluble a 0, 38,5, 77,0 y 154 nM usando HBS-EP+ y se usó como un analito. En la primera etapa de la medición, el anticuerpo en solución se unió a Proteína A/G, y se permitió que la solución de analito interaccionara con el anticuerpo. Después de tres minutos de interacción, la solución se cambió a HBS-EP+, y la fase de disociación se supervisó durante cinco minutos. Después de medición de la fase de disociación, la microplaca sensora se regeneró lavando con 10 µl de glicina-HCl 10 mM (pH 1,5). La asociación, disociación y regeneración constituyen un ciclo de análisis. Cada anticuerpo se midió de acuerdo con este ciclo. Los sensogramas obtenidos se analizaron cinéticamente usando el software de análisis de datos específico de Biacore, Software de Evaluación Biacore T100 (GE Healthcare Biosciences).

Aplicabilidad Industrial

La presente invención proporciona métodos para modificar los puntos isoelectrónicos de anticuerpos, métodos para purificar anticuerpos multiespecíficos y métodos para mejorar la farmacocinética en plasma de anticuerpos, todos los cuales están basados en la modificación de la carga de al menos un resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de la región determinante de complementariedad (CDR) conservando al mismo tiempo la actividad de unión a antígeno; composiciones farmacéuticas que comprenden como principio activo un anticuerpo con un punto isoelectrónico modificado; y métodos para producir las composiciones. Los anticuerpos multiespecíficos pueden purificarse eficazmente hasta alta pureza modificando el punto isoelectrónico del anticuerpo. Además, la farmacocinética de anticuerpo en plasma puede mejorarse modificando el punto isoelectrónico del anticuerpo. Dichos anticuerpos pueden producir un efecto terapéutico prolongado incluso cuando se reduce la frecuencia de administración. Debería observarse que los anticuerpos obtenidos por los métodos de la presente invención conservan la actividad de unión a antígeno.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Métodos para mejorar la farmacocinética de anticuerpos mediante sustitución de aminoácidos en CDR

<130> C1-A0708P2

<150> JP 2007-250165

<151> 26-09-2007

<150> JP 2007-256063

<151> 28-09-2007

<160> 246

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

ES 2 595 638 T3

<400> 1

Ser Asp His Ala Trp Ser
1 5

5
<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10
<400> 2

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

15
<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

20
<400> 3

Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

25
<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

30
<400> 4

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

35
<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 5

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

40
<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

45
<400> 6

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

50
<210> 7
<211> 30

ES 2 595 638 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

5

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

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

<210> 8

<211> 14

10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

15

<210> 9

<211> 32

20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

25

<210> 10

<211> 11

30

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Trp Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

35

<210> 11

<211> 23

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40

<400> 11

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

45

<210> 12

ES 2 595 638 T3

<211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 12

 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

10 <210> 13
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 13

 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

 Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

20 <210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 14

 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

25

30 <210> 15
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

35 <400> 15

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

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

<210> 16
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

ES 2 595 638 T3

180

185

190

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 17
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 18

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 19
<211> 330
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 19

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

ES 2 595 638 T3

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 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> 20
<211> 326
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 20

ES 2 595 638 T3

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	1	5	10	15
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	20	25	30	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	100	105	110	
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	115	120	125	
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	130	135	140	
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	145	150	155	160
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	165	170	175	
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	180	185	190	
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	195	200	205	
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	210	215	220	

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 21
<211> 327
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

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

ES 2 595 638 T3

[illegible]

<210> 22
<211> 119

ES 2 595 638 T3

<212> PRT
<213> Artificial

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

<400> 22

```

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115

```

10 <210> 23
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 23

```

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

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

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

```

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

<210> 24
<211> 324
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 24

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

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

ES 2 595 638 T3

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

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

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro

<210> 25
<211> 324
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 25

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

ES 2 595 638 T3

1		5		10		15									
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr
65					70					75					80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85						90					95	
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
			100					105					110		
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
		115					120					125			
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
	130					135					140				
Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
145					150					155					160
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
				165					170					175	
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
			180					185					190		
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
		195					200					205			
Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
	210					215					220				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
225					230					235					240
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
				245					250					255	

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu

<210> 26
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
<400> 26

Trp Asp His Ala Trp Ser
1 5

<210> 27
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
<400> 27

Thr Asp His Ala Trp Ser
1 5

<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
<400> 28

Asp Asp His Ala Trp Ser
1 5

<210> 29

ES 2 595 638 T3

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

5

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 29

10

Asn Asp His Ala Trp Ser
 1 5

15

<210> 30
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 30

25

Arg Asp His Ala Trp Ser
 1 5

30

<210> 31
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 31

40

Val Asp His Ala Trp Ser
 1 5

45

<210> 32
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 32

55

Phe Asp His Ala Trp Ser
 1 5

<210> 33
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 33

ES 2 595 638 T3

		Ala Asp His Ala Trp Ser
		1 5
5		<210> 34
		<211> 6
		<212> PRT
		<213> Artificial
		<220>
10		<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
		<400> 34
		Gln Asp His Ala Trp Ser
		1 5
15		<210> 35
		<211> 6
		<212> PRT
		<213> Artificial
20		<220>
		<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
		<400> 35
		Tyr Asp His Ala Trp Ser
25		1 5
		<210> 36
		<211> 6
30		<212> PRT
		<213> Artificial
		<220>
		<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
35		<400> 36
		Leu Asp His Ala Trp Ser
		1 5
40		<210> 37
		<211> 6
		<212> PRT
		<213> Artificial
		<220>
45		<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
		<400> 37
		His Asp His Ala Trp Ser
50		1 5
		<210> 38
		<211> 6
		<212> PRT
55		<213> Artificial
		<220>

ES 2 595 638 T3

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 38

Glu Asp His Ala Trp Ser
1 5

5

<210> 39

$\langle 211 \rangle$ 6

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

15 <400> 39

Cys Asp His Ala Trp Ser
1 5

20

<210> 40

 $\langle 211 \rangle$ 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 40

Ser Asp His Ala Ile Ser
1 5

30

<210> 41

 $\langle 211 \rangle$ 6

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 41

40

Ser Asp His Ala Val Ser
1 5

<210> 42

 $\langle 211 \rangle$ 16

<212> PRT

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

50

<400> 42

Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

55

<210> 43

<211> 16

ES 2 595 638 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

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

 <400> 43

 Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Arg Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

 10
 <210> 44
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

 15
 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 <400> 44

 20
 Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

 <210> 45
 <211> 16
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 30
 <400> 45

 Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

 35
 <210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

 <400> 46

 Ile Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

 45
 <210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 50 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 55
 <400> 47

ES 2 595 638 T3

		Val	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr
		1				5					10
5		<210> 48 <211> 10 <212> PRT <213> Artificial									
10		<220> <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente <400> 48									
		Thr	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr
		1				5					10
15		<210> 49 <211> 10 <212> PRT <213> Artificial									
20		<220> <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente <400> 49									
		Leu	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr
25		1				5					10
30		<210> 50 <211> 10 <212> PRT <213> Artificial									
35		<220> <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente <400> 50									
		Ser	Thr	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr
		1				5					10
40		<210> 51 <211> 10 <212> PRT <213> Artificial									
45		<220> <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente <400> 51									
50		Ser	Leu	Ala	Arg	Ala	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr
		1				5					10
		<210> 52 <211> 10 <212> PRT <213> Artificial									

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

5 <400> 52

Ser Leu Ala Arg Ile Thr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

10 <210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 53

Ser Leu Ala Arg Ser Thr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

20 <210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 54

30 <210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ser Met Asp Tyr
1 5 10

35 <220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 55

Ser Leu Ala Arg Thr Thr Val Met Asp Tyr
1 5 10

45 <210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 56

Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

55

5 <210> 57
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 10 <400> 57

 Leu Leu Ala Arg Ala Thr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

 15 <210> 58
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

 <400> 58

 Val Leu Ala Arg Ala Thr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

 25 <210> 59
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

 <400> 59

 35 Ile Leu Ala Arg Ala Thr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

 40 <210> 60
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 <400> 60

 Thr Leu Ala Arg Ala Thr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

 50 <210> 61
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

 55 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

ES 2 595 638 T3

<400> 61

Val	Leu	Ala	Arg	Ile	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr
1				5					10

5

<210> 62
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

15

<400> 62

Ile	Leu	Ala	Arg	Ile	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr
1				5					10

20

<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

25

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 63

Thr	Leu	Ala	Arg	Ile	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr
1				5					10

30

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

35

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 64

Leu	Leu	Ala	Arg	Ile	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr
1				5					10

40

<210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

45

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

50

<400> 65

Ser	Thr	Ala	Arg	Thr	Thr	Val	Leu	Asp	Tyr
1				5					10

ES 2 595 638 T3

<210> 66
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 66
 10
 Phe Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10
 <210> 67
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 20
 <400> 67
 Arg Ala Ser Arg Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10
 25
 <210> 68
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 68
 Arg Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10
 35
 <210> 69
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 69
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Phe Leu Asn
 1 5 10
 45
 <210> 70
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 55
 <400> 70

ES 2 595 638 T3

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Ser
1 5 10

5
<210> 71
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

10
<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
<400> 71

Tyr Gly Ser Arg Leu His Ser
1 5

15
<210> 72
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

20
<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
<400> 72

Gly Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

25
<210> 73
<211> 9
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
35 <400> 73

Asn Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

40
<210> 74
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

45
<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
<400> 74

Ser Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

50
<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

5 <400> 75

Gln Gln Ser Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

10 <210> 76
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 76

Gln Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr Thr
1 5

20 <210> 77
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 77

30 <210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 78

Gly Gln Gly Asn Ser Leu Pro Tyr Thr
1 5

45 <210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 79

Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr Thr
1 5

55

5 <210> 80
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 10 <400> 80

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

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

 15 <210> 81
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

 <400> 81

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

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

 25 <210> 82
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

 <400> 82

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

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

 40 <210> 83
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

ES 2 595 638 T3

<400> 83

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

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

5

<210> 84

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 84

15

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

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

<210> 85

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

25

<400> 85

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

30

<210> 86

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 86

Arg Val Thr Ile Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

40

<210> 87

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

5

<400> 87

Arg Val Thr Met Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

10

<210> 88

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 88

Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

20

<210> 89

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

30

<400> 89

Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

35

<210> 90

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 90

ES 2 595 638 T3

Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 91
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 91

Trp Gly Glu Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 92
<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 92

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

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 93
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 93

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 94
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 94

ES 2 595 638 T3

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 95
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 95

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 96
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 96

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 97
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 97

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 98
<211> 10

ES 2 595 638 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

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

 <400> 98

 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu
 1 5 10

 10
 <210> 99
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

 15
 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 <400> 99

 20
 Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly
 1 5 10 15

 <210> 100
 <211> 16
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 30
 <400> 100

 Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly
 1 5 10 15

 35
 <210> 101
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

 <400> 101

 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10

 45
 <210> 102
 <211> 7
 <212> PRT
 50 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 55
 <400> 102

ES 2 595 638 T3

Tyr Thr Ser Glu Leu His Ser
1 5

<210> 103
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
<400> 103

Tyr Gly Ser Glu Leu His Ser
1 5

<210> 104
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
<400> 104

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 105
<211> 107
<212> PRT

ES 2 595 638 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

5

<400> 105

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

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

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

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

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

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

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

10

<210> 106

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 106

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

20

<210> 107

<211> 414

<212> ADN

25

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized nucleotide sequence

30

<400> 107

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactcccag 60

gtccaaactgc aggagagcgg tccaggtctt gtgagaccta gccagaccct gaggcctgacc 120

ES 2 595 638 T3

tgcaccgtgt ctggctactc aattaccagc gatcatgcct ggagctgggt tcgccagcca 180
 cctggacgag gtcttgagtg gattggatac attagttata gtggaatcac aacctataat 240
 ccattctctca aatccagagt gacaatgctg agagacacca gcaagaacca gttcagcctg 300
 agactcagca gcgtgacagc cgcgcacacc gcgggtttatt attgtgcaag atccctagct 360
 cggactacgg ctatggacta ctgggggtcaa ggcagcctcg tcacagtctc ctca 414

<210> 108
 <211> 378
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> An artificially synthesized nucleotide sequence
 <400> 108

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactccgac 60
 atccagatga cccagagccc aagcagcctg agcgcacagc tgggtgacag agtgaccatc 120
 acctgtagag ccagccagga catcagcagt tacctgaatt ggtaccagca gaagccagga 180
 aaggetccaa agctgctgat ctactacacc tcagactgc actctggtgt gccaagcaga 240
 ttacagcggta gcggtagcgg taccgacttc accttcacca tcagcagcct ccagccagag 300
 gacatcgcta cctactactg ccaacagggt aacacgcttc catacacgtt cggccaaggg 360
 accaaggtgg aaatcaaa 378

<210> 109
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 109

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

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

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

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

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

305 310 315 320

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

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

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

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

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

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

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

<210> 110
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 110

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

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

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

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

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

305		310		315		320
Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser						
		325		330		335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro						
		340		345		350
Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val						
		355		360		365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly						
		370		375		380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp						
		385		390		395
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp						
		405		410		415
Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His						
		420		425		430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys						
		435		440		445

<210> 111

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 111

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

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

305		310		315		320									
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
				325					330					335	
Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
			340					345					350		
Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
		355						360				365			
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
	370					375					380				
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
385					390					395					400
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
			405						410					415	
Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
		420						425					430		
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
		435				440						445			

<210> 112
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 112

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

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

305					310					315					320
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
			325						330					335	
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
			340					345					350		
Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
		355					360					365			
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
	370					375					380				
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
385					390					395					400
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
				405					410					415	
Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
			420					425					430		
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys		
		435					440					445			

<210> 113
<211> 443
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 113

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

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

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

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

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

```

305                      310                      315                      320

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

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 114
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 114

```

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

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

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

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

```

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

305	310								315				320			
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	
				325					330					335		
Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
			340					345					350			
Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	
		355					360					365				
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	
	370					375					380					
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	
385					390					395					400	
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	
				405					410					415		
Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	
			420					425					430			
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu						
		435					440									

<210> 115
<211> 446
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 115

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

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

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

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

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

305					310					315					320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr
				325					330					335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
			340					345					350		
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
		355					360					365			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
	370					375					380				
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385					390					395					400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				405					410					415	
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
			420					425					430		
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro		
		435					440					445			

<210> 116
<211> 327
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 116

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				

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 117
<211> 443
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 117

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 595 638 T3

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn

ES 2 595 638 T3

420

425

430

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

<210> 118
<211> 324
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 118

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

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

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

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

ES 2 595 638 T3

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro

<210> 119

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 119

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

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

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

ES 2 595 638 T3

Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	50	55	60	
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Leu	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	65	70	75	80
Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110	
Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Val	Glu	210	215	220	
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	225	230	235	240
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	245	250	255	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	260	265	270	
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	275	280	285	

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 120

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 120

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

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

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

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

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

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

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

<210> 121

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 121

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Gln Asp
1 5 10 15

<210> 122

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 122

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Gln Asp
1 5 10 15

5

<210> 123
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

15

<400> 123

Arg Ala Ser Glu Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

20

<210> 124
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

25

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 124

Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5 10

30

<210> 125
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

35

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 125

Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser
1 5

40

<210> 126
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

45

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

50

<400> 126

Tyr Gly Ser Glu Leu Glu Ser
1 5

<210> 127

ES 2 595 638 T3

<211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 127
 10
 Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30
 <210> 128
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 128
 Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30
 <210> 129
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 129
 Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30
 <210> 130
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 130
 Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 131

ES 2 595 638 T3

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 131

10

Trp Gly Glu Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 132
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

20

<400> 132

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

25

<210> 133
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 133

Trp Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

35

<210> 134
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

45

<400> 134

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

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

ES 2 595 638 T3

His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Glu	Trp
	35						40					45			
Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Val	Leu	Ala	Arg	Ile	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Glu	Gly
			100					105					110		
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
		115					120					125			
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
	130					135					140				
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145					150					155					160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
				165					170					175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
			180					185					190		
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
		195					200					205			
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
	210					215					220				
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
225					230					235					240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
			245						250					255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
			260					265					270		

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 135

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 135

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

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 136
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 136

ES 2 595 638 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

```

<210> 137
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 137

5

ES 2 595 638 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Ser	Asp	Asp	20	25	30	
His	Ala	Val	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Glu	Trp	35	40	45	
Ile	Gly	Phe	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Thr	Leu	50	55	60	
Gln	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Leu	Leu	Ala	Arg	Ala	Thr	Ala	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Glu	Gly	100	105	110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220	

ES 2 595 638 T3

Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	225	230	235	240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	245	250	255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	260	265	270	
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	275	280	285	
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	290	295	300	
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	305	310	315	320
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	325	330	335	
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	340	345	350	
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	355	360	365	
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	370	375	380	
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	385	390	395	400
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	405	410	415	
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	420	425	430	
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	435	440	445	

Lys

<210> 138

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

5 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 138

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 595 638 T3

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 139
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 139

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

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

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

<210> 140
<211> 267
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 140

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

Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro
20 25 30

Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys
35 40 45

Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu
50 55 60

Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys
65 70 75 80

Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys
85 90 95

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

Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly
115 120 125

Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln
130 135 140

Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro
145 150 155 160

His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp
165 170 175

Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly
180 185 190

ES 2 595 638 T3

Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu
195 200 205

Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly
210 215 220

Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser Phe His Ala Ser Ser Ser Leu
225 230 235 240

Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His Tyr Cys Cys Ile Val Gln His
245 250 255

Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val Glu Leu
260 265

<210> 141
<211> 99
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 141

5

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

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

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

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

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

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

Arg Asp Met

10

<210> 142
<211> 443
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

ES 2 595 638 T3

<400> 142

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Arg	Pro	Ser	Gln	1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp	20	25	30	
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	35	40	45	
Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	50	55	60	
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Leu	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	65	70	75	80
Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110	
Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Val	Glu	210	215	220	
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu				

ES 2 595 638 T3

225		230		235		240									
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu
			245						250					255	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln
			260					265					270		
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
		275					280					285			
Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
	290					295					300				
Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys
305				310						315					320
Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
				325					330					335	
Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser
			340					345					350		
Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys
		355					360					365			
Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
	370					375					380				
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly
385					390					395					400
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln
			405					410						415	
Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn
			420					425					430		
His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro					
		435					440								

<210> 143
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 143

ES 2 595 638 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Arg	Pro	Ser	Gln	1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp	20	25	30	
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	35	40	45	
Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	50	55	60	
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Leu	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	65	70	75	80
Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110	
Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220	
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro				

ES 2 595 638 T3

225		230		235		240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser						
		245		250		255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp						
		260		265		270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn						
		275		280		285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val						
		290		295		300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu						
		305		310		315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys						
		325		330		335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr						
		340		345		350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr						
		355		360		365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu						
		370		375		380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu						
		385		390		395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys						
		405		410		415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu						
		420		425		430
Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly						
		435		440		445

Lys

<210> 144

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

5

<400> 144

ES 2 595 638 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Arg	Pro	Ser	Gln	1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp	20	25	30	
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	35	40	45	
Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	50	55	60	
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Leu	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	65	70	75	80
Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110	
Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Val	Glu				

ES 2 595 638 T3

210	215	220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu 225 230 235 240		
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu 245 250 255		
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln 260 265 270		
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys 275 280 285		
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu 290 295 300		
Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys 305 310 315 320		
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys 325 330 335		
Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser 340 345 350		
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys 355 360 365		
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln 370 375 380		
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly 385 390 395 400		
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln 405 410 415		
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala 420 425 430		
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro 435 440		

<210> 145

ES 2 595 638 T3

<211> 119
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 145

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

10 <210> 146
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 146

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 147

<211> 120

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 147

5

ES 2 595 638 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120

<210> 148

<211> 107

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 148

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

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 149

<211> 122

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 149

5

ES 2 595 638 T3

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

<210> 150
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 150

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 151
<211> 324
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 151

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

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

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

Ser Leu Ser Pro

<210> 152

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 152

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

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 153

<211> 324

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 153

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

ES 2 595 638 T3

35						40						45					
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser		
50						55					60						
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr		
65					70					75					80		
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys		
			85						90					95			
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro		
			100					105					110				
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp		
		115					120					125					
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp		
	130						135				140						
Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly		
145					150					155					160		
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn		
				165					170					175			
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp		
			180					185					190				
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro		
		195					200					205					
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu		
	210						215				220						
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn		
225					230					235					240		
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile		
				245					250					255			
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr		
			260					265					270				
Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys		
		275					280					285					

ES 2 595 638 T3

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

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

Ser Leu Ser Pro

<210> 154
<211> 326
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 154

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

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

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

ES 2 595 638 T3

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

<210> 155
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 155

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

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

260

265

270

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 156

<211> 326

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 156

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Ser Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

ES 2 595 638 T3

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

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

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

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 157
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
<400> 157

ES 2 595 638 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Arg	Pro	Ser	Gln	1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp	20	25	30	
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	35	40	45	
Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	50	55	60	
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Leu	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	65	70	75	80
Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110	
Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Val	Glu	210	215	220	
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	225	230	235	240

ES 2 595 638 T3

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 158
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 158

ES 2 595 638 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Arg	Pro	Ser	Gln	1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp	20	25	30	
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	35	40	45	
Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	50	55	60	
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Leu	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	65	70	75	80
Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110	
Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Ser	Val	Glu	210	215	220	
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	225	230	235	240

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

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

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

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

<210> 159

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 159

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 160
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

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

<400> 160

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 161

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 161

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 162
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
<400> 162

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 163

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 163

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

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

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

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

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

ES 2 595 638 T3

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

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

<210> 164
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 164

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

ES 2 595 638 T3

					165						170						175
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu		
			180					185					190				
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn		
		195					200					205					
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly		
	210					215					220						
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu		
225					230					235					240		
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr		
			245						250					255			
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn		
			260					265					270				
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe		
		275					280					285					
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn		
	290					295					300						
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Ala	His	Tyr	Thr		
305					310					315					320		
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro										
					325												

<210> 165
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 165

Asp	Asp	His	Ala	Val	Ser
1				5	

<210> 166
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 595 638 T3

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 166
 5
 Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu Gln Asp
 1 5 10 15
 <210> 167
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 15
 <400> 167
 Leu Leu Ala Arg Ala Thr Ala Met Asp Val
 1 5 10
 20
 <210> 168
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 168
 Tyr Gly Ser Glu Leu Glu Ser
 1 5
 30
 <210> 169
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 40
 <400> 169
 His Asp His Ala Trp Ser
 1 5
 45
 <210> 170
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 170
 Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Gln Gly
 1 5 10 15
 55

ES 2 595 638 T3

5 <210> 171
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 10 <400> 171

 Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

 15 <210> 172
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 20
 <400> 172

 Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His Leu Asn
 1 5 10

 25 <210> 173
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

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

 <400> 173

 Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser
 1 5
 35

 <210> 174
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40

 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 45 <400> 174

 Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu Gln Gly
 1 5 10 15

 50 <210> 175
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 55 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

 <400> 175

ES 2 595 638 T3

Gln Ala Ser Arg Asp Ile Ser Ser His Leu Asn
1 5 10

<210> 176
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 176

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 177
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 177

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 178
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 178

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

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

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

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

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

ES 2 595 638 T3

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 179
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 179

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

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

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

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

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

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

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

<210> 180
<211> 443
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 180

ES 2 595 638 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	His	Ser	Ile	Ser	His	Asp	20	25	30	
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Glu	Trp	35	40	45	
Ile	Gly	Phe	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	50	55	60	
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Glu	Gly	100	105	110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	Val	Glu	210	215	220	
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	225	230	235	240

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

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

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

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

<210> 181
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 181

ES 2 595 638 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

ES 2 595 638 T3

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

5

<400> 182

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

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

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

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

<210> 183
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

ES 2 595 638 T3

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 183

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

ES 2 595 638 T3

<210> 184
 <211> 32
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 10 <400> 184

 Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

 15 <210> 185
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
 <400> 185

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 595 638 T3

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

ES 2 595 638 T3

370

375

380

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

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

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

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

<210> 186

<211> 30

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 186

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

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

15

<210> 187

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 187

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

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

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

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

25

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

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

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

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

<210> 188

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 188

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

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

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

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

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

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

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

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

<210> 189

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 189

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

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

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

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

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

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

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

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

<210> 190

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 190

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

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

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

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

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

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

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

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

<210> 191

<211> 326

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 191

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

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 192

<211> 324

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 192

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

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

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

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

ES 2 595 638 T3

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro

<210> 193

<211> 326

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 193

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

ES 2 595 638 T3

35					40					45					
Gly 50	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala 55	Val	Leu	Gln	Ser	Ser 60	Gly	Leu	Tyr	Ser
Leu 65	Ser	Ser	Val	Val	Thr 70	Val	Pro	Ser	Ser	Asn 75	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr 80
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val 85	Asp	His	Lys	Pro	Ser 90	Asn	Thr	Lys	Val	Asp 95	Lys
Thr	Val	Glu	Arg 100	Lys	Ser	Cys	Val	Glu 105	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro 110	Ala	Pro
Pro	Val	Ala 115	Gly	Pro	Ser	Val	Phe 120	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys 125	Pro	Lys	Asp
Thr	Leu 130	Met	Ile	Ser	Arg	Thr 135	Pro	Glu	Val	Thr	Cys 140	Val	Val	Val	Asp
Val 145	Ser	His	Glu	Asp 150	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn 155	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly 160
Val	Glu	Val	His	Asn 165	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro 170	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe 175	Asn
Ser	Thr	Phe	Arg 180	Val	Val	Ser	Val	Leu 185	Thr	Val	Val	His	Gln 190	Asp	Trp
Leu	Asn 195	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys 200	Cys	Lys	Val	Ser	Asn 205	Lys	Gly	Leu	Pro
Ala 210	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile 215	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly 220	Gln	Pro	Arg	Glu
Pro 225	Gln	Val	Tyr	Thr 230	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu 235	Glu	Met	Thr	Lys	Asn 240
Gln	Val	Ser	Leu	Thr 245	Cys	Leu	Val	Lys	Gly 250	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp 255	Ile
Ala	Val	Glu	Trp 260	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln 265	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr 270	Lys	Thr
Thr	Pro 275	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp 280	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu 285	Tyr	Ser	Lys

ES 2 595 638 T3

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 194

<211> 324

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 194

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

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

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

ES 2 595 638 T3

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

<210> 195
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena H de anticuerpo humanizado

<400> 195

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

ES 2 595 638 T3

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 196
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena H de anticuerpo humanizado

<400> 196

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 Asp Tyr
20 25 30

Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

ES 2 595 638 T3

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 197
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena H de anticuerpo humanizado
<400> 197

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

Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Ser Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 198
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena H de anticuerpo humanizado
<400> 198

ES 2 595 638 T3

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 199
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cadena H de anticuerpo humanizado

<400> 199

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

Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

ES 2 595 638 T3

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

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 200
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena H de anticuerpo humanizado
<400> 200

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 Asp Tyr
20 25 30

Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 201
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena L de anticuerpo humanizado

ES 2 595 638 T3

<400> 201

```

Asp Val 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 Gln Ser Leu Val His Ser
          20          25          30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35          40          45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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 Ser Gln Asn
          85          90          95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110

```

5

<210> 202
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Cadena L de anticuerpo humanizado

15

<400> 202

```

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 Gln Ser Leu Val His Ser
          20          25          30

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

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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

```

ES 2 595 638 T3

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

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 203
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena L de anticuerpo humanizado

<400> 203

Asp Val 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 Ala Ser Glu Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 204
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena L de anticuerpo humanizado

<400> 204

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

ES 2 595 638 T3

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Arg Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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 Ser Gln Asn
85 90 95

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

<210> 205

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Cadena L de anticuerpo humanizado

<400> 205

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 Ala Ser Glu Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

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

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

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

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

ES 2 595 638 T3

<210> 206
 <211> 112
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cadena L de anticuerpo humanizado
 10 <400> 206

```

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

      Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Arg Ser Leu Val His Ser
              20              25              30

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

      Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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 Ser Gln Asn
              85              90              95

      Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
              100              105              110
  
```

<210> 207
 15 <211> 545
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 207
 20

```

      Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser
      1              5              10              15

      Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro
              20              25              30

      Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys
              35              40              45

      Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn
              50              55              60
  
```

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Thr
305 310 315 320

Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala
325 330 335

Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala
340 345 350

His Val Glu His Glu Glu Thr Leu Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile
355 360 365

Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr
370 375 380

Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn
385 390 395 400

Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly
405 410 415

Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu
420 425 430

Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu
435 440 445

Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu
450 455 460

Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ala Gly Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu
465 470 475 480

Cys Ile Gly Gly Ala Gly Asp Gly Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu
485 490 495

Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro
500 505 510

Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe
515 520 525

His Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys His His His His His
530 535 540

His

545

5	<210> 208 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente	
	<400> 208 ggatcctgcg catgaaaaag cctgaactca cc	32
15	<210> 209 <211> 29 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente	
	<400> 209 gcggccgcct attcctttgc cctcgagcg	29
25	<210> 210 <211> 10939 <212> ADN <213> <i>Cricetulus griseus</i>	
30	<400> 210	
	gagctcaatt aaccctcact aaagggagtc gactogatcc tttacagaaa acttgcaaac	60
	cctcttggag tagaaaagta gtagtatctg acacaagtat cagcaaaatg caaacttctc	120
	cccatcccca gaaaaccatt ataaaaaccc ccatatctta tgcccaactg tagtgatata	180
	ttatttatga tttattaaaa ctgtcttaag gattcagaaa gcaaagtcag ccttaagcta	240
	tagagaccag gcagtcagtg gtggtacaca cctttaatcc caggactcag gattaagaag	300
	tagacggacc tctgttagtt caagtctacc attacctaca caagagtga gagtaaccga	360
	tctcatgcct ttgatcccag cagctgggat catgtgcatt caatcccagc attcgggagt	420
	tatataagac aggagcaagg tctcagagct ggcattcatt ctccagccac attgaggata	480
	ggaaaacatt gaagtgtcag gatgctgagg agaggcagca gtttgagggt tggtagaacc	540
	aggatcacct tttggtctga ggtagagtaa gaactgtggc tggetgcttt gcttttctga	600
	tcttcagctt gaagcttgaa ctccaatatt tgtctctggg totattatta tcatgttaca	660
	cctaacttta aagctgattt acgcaagaca gttgtaggtg gacctttctt tctgcccac	720
	cagttcccaa ataactgaca cggagactca atattaatta taaatgattg gttaatagct	780
	cagtcttggt actggctaac tcttacattt taaattaact catttccatc cctttacttg	840

ES 2 595 638 T3

ctgccatgtg gttcatggct tgttcaagtc ctgcttcttc tgtctctggc tggatgatgcc 900
 tctgggttctg ccttttatcc cagaattctc ctagtctggc tctcccgccc agctataggg 960
 cagtcagctg tttattaacc aatgagaata atacatattt atagtgtaca aagattgctc 1020
 ctcaacaccc aattttttat gtgcaacctg agaactctga ctcatcgccc tcatgcttgc 1080
 agaggcgga cctttacca ctaagccacc tttctagccc tgttgctttt gttttttgag 1140
 acaggttcca ctatgtagcc caggctggcc tcaaactgac cattctcctg cctaaacctc 1200
 ccgaacactg gaattatagt caaggcctac ctgccctggc attttcacac ttttatttcc 1260
 tggtctgagtc cattgacttt acactcatca aggttgaacc agttggagtt taattacagt 1320
 gccaatcgca ctgaatccca cataatcaaa caacttcaag gaagcaaaaa accagttttt 1380
 cctgaagatc aatgtcagct tgctgattc agaataagacc ccgaaaaaa ggcaaatgct 1440
 tgataaccaa tttcttctta ttgttcaatc cctgctgct gtgtgtaagc tcttgagaaa 1500
 ggacagtaag gggacattca tgatcagaga aagagcccca actccccccc cagccccacc 1560
 cccacctgt ccacagtctg ttggtttggc tccccctgg ctgacacca gaaatcacia 1620
 cataatcacc taggtcactg taacaagttc ctttctggaa aatgtacaaa atgatattgg 1680
 taacatgagt aatgaataat gcttgagtc caactccctt gtgaccacgc aatgttttcc 1740
 gtgggtgctc ccttccccag ctgcaggcct gacatgtacc ttaaaaagcc tccccggag 1800
 gacagaattt tgtgggtact atagtgttct cacaataact tccccataa ccttactta 1860
 gttaccataa ataacatgca gccctggtg aggcacacag ggtccaatg tacagcttct 1920
 cagacactgc aggaaccttc ctctccta atgcagctgg tctcttcagg ctggacagca 1980
 ggaaccata ccaactcaat cctagtgtgg agtagagctg tctacgaaaa ccagcagatc 2040
 tatagctaaa tgtgtttcaa ttttatgctt tgacaaattg tactgacccc acccccaccc 2100
 cttccccctt gctgtgctgg gaattgaacc caggaccttg tgcattgccag gcaagtactc 2160
 taacactgag ctatagcccc aatctttcat ccaagtctct atgtg-gccc aactcgtt 2220
 tttattttga gacaaaaggt tcttattttg agataaggtc tcaactatgtt gccttgaatt 2280
 tttttttttt ttttttttga acttttgacc tcttacctc agctgagact acaagtcttt 2340
 taccatcagg ccggtgat ggtaaaataa cagtatttga aatagttaa acacatcatc 2400
 ttaatggtca accacacaat ttccgaaatg ttgctggctc agtctggggc aaacctgtcc 2460
 gccccacat tgggtctagg aagaaagcac agacaagtag cctcccagc tcaggagtaa 2520
 aagacctgga ggggggtggc cacttcggtc aagttcacgg gatggggagg ggtacctcc 2580
 tccagtagtg gtggtatttg gcagttctc caccgacgcc ctctggaagc acctgcttgg 2640
 acccgcaaag ccaggaatgc agcttctcctc agggactcgc cagcgagggt aacaggacag 2700

ES 2 595 638 T3

aggcgtccca agagggctgg ggcggaaggg ggaagacagg gtcggcctta gatagggcaa 2760
 agggccttct ggctgtgttc cgggggtaac cgccccacca cgcttgagc cggacgtggc 2820
 gagcgatggg gacagcgagc aggaagtcgt actggggagg gccgcgtagc agatgcagcc 2880
 gagggcggcg ctgccaggta cacccgaggg caccgcgggg gtgagcgcca ggtccctgaa 2940
 ccagccaggc ctccagagcc gaggccggcg gaccgacggc acgttctgga atgggaaggg 3000
 atccgggaca ccgaattgct gcattgaggg gtcagaggt tctgatgtgg gaggccagaa 3060
 agggttttat ctaccggagg tgatgtgact tccggcctct ggaagtgtcg ttggagtctc 3120
 tgggaccttg ggtcctctcg actaggtttg gaaggggtga aataggggta gggagaaagg 3180
 agaggactgc agcaatgtct tcccgaacga cctgggttcg ggaggggtcg aaggacaagg 3240
 ggctgttggt gggggtcttc agacgcggag ggggtgtatt ctattttctg ggaagatggc 3300
 gtcgatgcac ttgaccaagt ctagtcgac tgaagaggct aggggaacag acagtgagag 3360
 aggatggtgg agggagtggc agaacccttc cagaaactgg gagaggctct agcacctgca 3420
 accccttccc tggcctccgg ggagtcaccg aagagggcag gaccatggac acagggtgcat 3480
 tcgtgccggc gcgctccggc ctggcgaagg tgcgcgtct tggaggccgc gggagggccca 3540
 gacgcgcgcc cggagagctg gccctttaag gctacccgga ggctgtcag gaaatgcgcc 3600
 ctgagccgc cctcccgga acgcggccc agacctggca agctgagacg gaactcggaa 3660
 ctgacactcg gtcgcggcc tcggtgaggc cttgcgccc coatgcctct gtcattgccc 3720
 ctcgggccgc ctccctgaac ctccgtgacc gccctgcagt cctccctccc ccccttcgac 3780
 tcggcggggc cttccggggc ctcccgagc cgcacctca cgtagccac acctccctct 3840
 cggcgctccg cttccacgc ggtcccgac ctgtttttc ctctccacc ctgcccttct 3900
 gtccctctcc cttcctttct cccctcgact cgtccctatt aggcaacagc cctgtgggtc 3960
 cagccggcca tggctgtcaa ggctcacacc cttagctagg ccccttctcc cttccctggg 4020
 tcttgtctca tgacccccg ccccgcccg gagcgagcg gatgtggagc agtgccctcg 4080
 gcaagcagaa cttcacccaa gccatgtgac aattgaaggc tgtaccccca gaccctaaca 4140
 tcttgagacc ctgtagacca gggagtgtt ctggccgtgg ggtgacctag ctcttctacc 4200
 accatgaaca gggccctct gaagcggctc aggatcctgc gcatggcgct gactggaggc 4260
 tccactgct ctgaggaggc agatgaagac agcaggaaca agccgtttct gctgcggggc 4320
 ctgcagatcg cgctggctgt ctctctctac tgggtcacct ccctctccat ggtattcctc 4380
 aacaagtaac tgctggacag cccctccctg cagctggata cccctatctt cgtcactttc 4440
 taccaatgcc tggtgacctc tctgtgtgc aagggcctca gcactctggc cacctgctgc 4500

ES 2 595 638 T3

cctggcaccg ttgaactccc caccctgaac ctggacetta aggtggcccg cagcgtgctg 4560
ccaciglcgg tagcttccat tggcatgata aglllcaala accctcgcc ccaaglacgla 4620
gggggtggcct tctacaacgt ggggcgctcg ctcaccaccg tgttcaatgt gcttctgtcc 4680
tacctgctgc tcaaacagac cacttccttc tatgccttgc tcacatgtgg catcatcatt 4740
ggtgagtggg gcccgggggc tgtgggagca ggatgggcat cgaactgaag ccctaaaggt 4800
caacactgta ggtaccttta cttactgtcc caggteccct gcacagcag ttacaggaag 4860
agccctgtag aaaacaaata acttccttat ggtcattcaa caagttaggg acccagccag 4920
ggtgaaaata atgttagcag caactacagc aaagatggct ctgcgcactt gcatgattaa 4980
aatgtgccag gtactcagat ctaagcattg gatccacatt aactcaacta atccctatta 5040
caaggtaaaa tatatccgaa ttttacagag ggaaaaccaa ggcacagaga ggctaagtag 5100
cttgaccagg atcacacagc taataatcac tgacatagct gggatttaaa cataagcagt 5160
tacctccata gatcacacta tgaccaccat gccactgttc cttctcaaga gttccaggat 5220
cctgtctgtc cagttctctt taaagaggac aacacatctg acattgctac cttgaggtaa 5280
catttgaaat agtgggtaga catatgtttt aagttttatt cttacttttt atgtgtgtgt 5340
gtttgggggg ccaccacagt gtatgggtgg agataagggg acaacttaag aattggtcct 5400
ttctcccacc acatgggtgc tgaggctcga actcaggltca tcaggattgg cacaaalccc 5460
tttaccact gagccatttc actggtccaa tatatgtgtg cttccaagag gctttaacta 5520
ttttcccaga tgtgaatgtc ctgctgatca ttatccctt ttaccggaa gccctctggg 5580
aggtgccatc cctgtggtcg tctgcataca aatggggaaa ctgcaactca gagaaacaag 5640
gctacttgc agggcccccac aagtaagata ggctgggatg ccaccccaga ctggccacac 5700
tccttgccct gtgcttcaag ccagtttact ttgttcttgc ccattggaag ttagcatggt 5760
gcagtcaaac acaataacta caggccaaaa gtgcttttaa attaaagtca gatgaacttt 5820
taaacatcca gagctcctca actgcaggag ttacaacctg attctgcaac catctttgca 5880
gtgcccggta gtcatatgta gctagagget cttggetagg acagcatgtg ttaggaaca 5940
tctggccctg agatcattga attgagtgc tctgggtga caaagaccaa ggcatccgtt 6000
ccctgagagt cctgggcaag cagcaatgtg accttcattt gtacctactc aggttcttta 6060
tctgtcctgt ttgacctact tagtctctc tgggtgtctc gaggccagg ctgggtactc 6120
tggtatgtcag gatcaggcca atgcgcacat ctgcctaga aatgtccccc tggttgagca 6180
gtcctgaat ccacggtaa agggctctga ccaggaggga gtcagataaa aagctgacag 6240
cactggggga ctccatgggg aactcccacc tgccccaca catccatcct aagagaactg 6300
gtattccttg ttccctcttt gtctacaag gcacctggg atcccacttc agtctcccag 6360

ES 2 595 638 T3

ccttgccagg gttagagggc atgagcctcc ttgtggggaa tttagatgca agaaggtaca	6420
gtcactagag aacctgagct cagatcccca aagtaaccag tacctgatag tgaggcagct	6480
gagaaccgca gcagcctgcc tgagtggctg aactctgcgg cctccggaac tggccccaac	6540
tggtgggtct cctcttcctt cctcctgtga gggagggccc atctctgata agtgctgtgg	6600
ggactctaga gtagggagga ggaggagcaa tctaagcagg ccttactgag aagtccttgc	6660
tggcatgtgg ctgcctgagg agtacagact gggaacaccc atttgaatga gtaaggtttt	6720
tctgaaggc catggggagc cacggaggaa aatcatttta gttacaagac aaagagtaga	6780
ttggttaaca tgggagcaag gacatggccc caattttcat agatgaagga aattggaact	6840
cagagaggtt aagtaacttc tcccaaatac ctacagcttc aaatcacaga acagtcagag	6900
tctagatctc tctgatgctt gtgatggctc tgcattcca tgttgctgat cctgtggca	6960
tcagtaagcc tctaccttgt gggaaatgcag gatctaaatg aagagaggaa gtgctggccc	7020
catgctgtgg tctggaaagc tatgcaggct ctttgagcag agagtgaccc acaagtgaat	7080
agagtccat gagactcaaa gcaacatcca ccttaagca gctctaacca aatgctcaca	7140
ctgagggagc caaagccaag ttagagtctt gtgcttgccc aaggctactt tgccctggccc	7200
tctcctata gcacccgtgt tatcttatag cctcattac agtgattaca attataatta	7260
gagaggtaac agggccacac tgtccttaca cattccctg ctagattgta gctgggagag	7320
ggggagatgt aggtggctgg gggagtggga gggaagatgc agattttcat tctgggctct	7380
actccctcag ccattttttg gtgtgggagt tagactttgg atatgttgat gatgaggtaa	7440
gggocacaga acagtctgaa ctgtggtatc agaatcctgt cctctccct ctctcctcat	7500
ccctcttcac cttgtcactc ctctgtctgc tacagggtgt ttctggctgg gtatagacca	7560
agagggagct gagggcacc tgtccctcat aggcaccatc ttcggggtgc tggccagcct	7620
ctgcgtctcc ctcaatgcca tctataccaa gaaggtgctc ccagcagtgg acaacagcat	7680
ctggcgcta accttctata acaatgtcaa tgctgtgtg ctcttcttgc cctgatgggt	7740
tctgctgggt gagctccgtg cctccttga ctttgctcat ctgtacagtg cccacttctg	7800
gctcatgatg acgctgggtg gcctcttcgg ctttgccatt ggctatgtga caggactgca	7860
gatcaaattc accagtcccc tgaccacaaa tgtatcaggc acagccaagg cctgtgcgca	7920
gacagtgtg gccgtgctct actatgaaga gactaagagc ttctgtgggt ggacaagcaa	7980
cctgatgggt ctgggtggct cctcagcta tacctgggtc aggggctggg agatgcagaa	8040
gacccaagag gacccagct ccaaagaggg tgagaagagt gctattgggg tgtgagcttc	8100
ttcagggacc tgggactgaa cccaagtggg gcctacacag cactgaaggc ttcccatgga	8160

ES 2 595 638 T3

gctagccagt gtggccctga gcaatactgt ttacatcctc cttggaatat gatctaagag 8220
 gagccagggc ctttctcgtt aatgtcagaa agctgccaaa tctcctgtct gcccctcttt 8280
 gttttgggaa aacctacca ggaatggcac cctacctgc ctctcctag agcctgtcta 8340
 cctccataac atctctgggg ttgggaccag ctgcagcctt aaggggctgg attgatgaag 8400
 tgatgtcttc tacacaaggg agatgggttg tgatcccact aattgaaggg atttgggtga 8460
 cccacacact ctgggatcca gggcaggtag agtagtagct taggtgctat taacatcagg 8520
 aacacctcag cctgcctttg aagggaggtg ggagcttggc caagggagga aatggccatt 8580
 ctgccctctt cagtgtggat gagtatggca gacctgttca tggcagctgc accctggggt 8640
 ggtgataag aaaacattca cctctgcatt tcatatttgc agctctagaa cgggggagag 8700
 ccacacatct tttaagggtt aagtagggcg atgagctcct ccgcagtcct taaccccagc 8760
 ttacactgcc tggttccctt tggcccagct acctagctgt actcccttct tgtactcttc 8820
 tcttctcctt catggcctcc cccaacacct ccatctgcag gcaggaagtg gagtccactt 8880
 gtaacctctg tcccatgac agagcccttc gaataacctga accctcatg acagtaagag 8940
 acatttatgt tctctggggc tggggctgaa ggagcccact ggttctcact tagcctatct 9000
 ggctcctgac aaaaaaaaaa aaaaagaaaa aaaaaagca laaaccaagc lactaagaac 9060
 agaagtggc ttataacgtt ctggggcagc aaagcccaga tgaagggacc catcgacct 9120
 ctctgtccat atctcctg tgcagaagta caggcaagct cctttaagcc tcatatagga 9180
 acactagcct cactcatgag ggttttactc catgacctgt caacctcaaa gccttcaaca 9240
 tgaggactcc aacgtaaatt tggggacaga agcactcaga ccatacccca gcaccacacc 9300
 ctctaacct cagggtagct gtcattctcc tagtctctc tcttgggcct ttagaacccc 9360
 catttctctg gggtaatgtc tgatgttttc gtccctgtca taaaaagatg gagagactgt 9420
 gtccagcctt tgattcctac ttctacaaat ccaggttct aatgaagttt gtggggcctg 9480
 atgccctgag ttgtatgtga ttttaataata aaaaagcaag atacagcatg tgtgtggact 9540
 gagtgagggc cacagggatc taaaagccaa gtgtgagggg acccagctac agcaggcagc 9600
 atcctgagcc tggaatctct tcaggacaag aattctccat atacctacct actctgggga 9660
 gtaggtggcc agagttcaag ctcccttag taccaactac cactggctgt gctcttactg 9720
 aaggcagaca tggcactgag tgctgtccat ctgtcactca tctccacagc cattcctaatt 9780
 gtgtggggcg ggagccatca ccaaaccoca ttttcagata aggacacagg ctgagagagg 9840
 cttgtgtgga gaaaagtagc agcagaattc agagagctgg gtctcctgca gcaccttga 9900
 ctgccagcag ccacagtgt tgtcacacag cacatactca aaagaatgcc agccccctca 9960
 gctagagcg cctggccttt ctttcagatg aggaagagcg tcaagctgt tagcttgcct 10020

ES 2 595 638 T3

accatatgac cacatacatg accaacagct tgagggaggg aggattactg tggctcccag 10080
cctgagaggt gggacaccca aatgtattag gtccttgaat cagggctgac cttgtgattc 10140
agtcactcct accagaatgc tggggaatgg ggatgccaaa ggcaaaggag gctttctaag 10200
gtgtgggtgta agataggcat ttctgcttcc atgtacacct gtgagcagag taggaaggcc 10260
ctgtggagaa tatatcccac aaaccagtag cccttctctg cagtgggtga atactgccac 10320
cctatacccc tatgcaaggc cagtagaacc acccaaccca caacatctag agaaattaca 10380
ggtcattetta agcctctaaa ttgtggagaa actcgacatg cgcacgattc ctaacctgct 10440
agcctagggt ggggggtgga taatttaagg aaactggggt ttcttataga atcggaggct 10500
ccatgaagtc accctgacaa gaggtcagca atagccagca gcagtggcta ctctaagcc 10560
tccagacaga gcacctgtg aatgtacctt attctcacat ctgggtgtct ataggtgtga 10620
ctgggtcaga tgtcacccag gccattgcaa tgggccccta gcccctatgg gtgttgggat 10680
agcagccaag cagctcccat gctgagatac tgctgcagt agactgatgg ataagaaaac 10740
aaggcccaaa atgttttctt tccagacttg atctttcttt gttcaaaaat gctgttttcc 10800
cttaaacttg cccaaaccca ttgttttgca gttgaggaaa ataaggcata gaaagattaa 10860
aggaagtttc tgaggttaca gagcaaagta ctggcttcac ctgaaataga cagggtgtgcc 10920
ctgatcctga tttgagctc 10939

<210> 211
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente

10

<400> 211
atgcatgcca ccatgaaaaa gcctgaactc acc

33

<210> 212
<211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

15

<220>
<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente

20

<400> 212
ggatcccagg ctttactt tatgctc

28

<210> 213
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

25

<220>
<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente

30

	<400> 213 gctgtctgga gtactgtgca tctgc	25
5	<210> 214 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente <400> 214 ggaatgcagc ttctcaagg gactcgc	27
15	<210> 215 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente	
25	<400> 215 tgcacaggt cggagacgct gtcgaac	27
30	<210> 216 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente <400> 216 gcactcgtcc gagggcaaag gaatagc	27
40	<210> 217 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente <400> 217 tgtgtctggga attgaacca ggac	24
50	<210> 218 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente <400> 218 ctactgtct gtgcttctt cc	22
60	<210> 219 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente <400> 219	

ES 2 595 638 T3

ctcgactcgt ccctattagg caacagc 27

<210> 220
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente

<400> 220
 tcagaggcag tggagcctcc agtcagc 27

<210> 221
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 221

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

ES 2 595 638 T3

Ala	Arg	Val	Leu	Ala	Arg	Ile	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly			
			100					105					110					
Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe			
		115					120					125						
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu			
	130					135					140							
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp			
145					150					155					160			
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu			
				165					170					175				
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser			
			180					185					190					
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro			
		195					200					205						
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys			
	210					215					220							
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro			
225					230					235					240			
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser			
				245					250					255				
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp			
			260					265					270					
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn			
		275					280					285						
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val			
	290					295					300							
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu			
305					310					315					320			
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys			
				325					330					335				

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 222

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 222

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

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

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

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

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

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 223

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 223

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

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

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

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

ES 2 595 638 T3

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

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 224

<211> 214

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 224

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

ES 2 595 638 T3

50

55

60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 225

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 225

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

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

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 226
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 226

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

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 227

<211> 449

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 227

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln

ES 2 595 638 T3

1		5		10		15													
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp				
			20					25					30						
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp				
		35					40					45							
Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu				
	50					55					60								
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Leu	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser				
65					70					75					80				
Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
				85					90					95					
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly				
			100					105					110						
Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe				
		115					120					125							
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu				
	130					135					140								
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp				
145					150					155					160				
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu				
				165					170					175					
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser				
			180					185					190						
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro				
		195					200					205							
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys				
	210					215					220								
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro				
225					230					235					240				
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser				
				245					250					255					

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 228

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 228

ES 2 595 638 T3

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu	1	5	10	15
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Ser	Asp	Asp	20	25	30	
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Glu	Trp	35	40	45	
Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	65	70	75	80
Leu	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Glu	Gly	100	105	110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220	
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	225	230	235	240

ES 2 595 638 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 229
<211> 214
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 229

ES 2 595 638 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 230
 <211> 214
 <212> PRT

ES 2 595 638 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

5

<400> 230

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 231
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10

<400> 231

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
          180          185          190
    
```


ES 2 595 638 T3

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 232

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 232

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Ser Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

ES 2 595 638 T3

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 233

<211> 445

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 233

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 Asp Tyr
20 25 30

Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Asn Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

ES 2 595 638 T3

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

ES 2 595 638 T3

405

410

415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 234

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 234

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 Asp Tyr
20 25 30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

ES 2 595 638 T3

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

ES 2 595 638 T3

405

410

415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 235

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 235

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Thr Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Glu Ser Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

ES 2 595 638 T3

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

ES 2 595 638 T3

405

410

415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 236

<211> 219

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 236

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Arg Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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 Ser Gln Asn
85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

5

10

ES 2 595 638 T3

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 237

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 237

Asp Val 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 Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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 Ser Gln Asn
85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

ES 2 595 638 T3

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 238

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 238

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 Gln Ala Ser Glu Ser Leu Val His Ser
20 25 30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe 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 Ser Gln Asn
85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

ES 2 595 638 T3

130	135	140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
145	150	155
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
	165	170
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
	180	185
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
	195	200
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
	210	215

<210> 239
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 239

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Ile Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Asp Gly Pro Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

ES 2 595 638 T3

Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	130	135	140	
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	145	150	155	160
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	165	170	175	
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	180	185	190	
Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	195	200	205	
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys	210	215	220	
Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	225	230	235	240
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	245	250	255	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	260	265	270	
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	275	280	285	
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	290	295	300	
Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	305	310	315	320
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	325	330	335	
Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	340	345	350	
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	355	360	365	

ES 2 595 638 T3

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 240

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 240

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Ile Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Gln Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Asp Gly Pro Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

ES 2 595 638 T3

Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala
130						135					140				
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
145					150					155					160
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
				165					170					175	
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
			180					185					190		
Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His
		195					200					205			
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys
	210					215					220				
Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val
225					230					235					240
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
				245					250					255	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
			260					265					270		
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
		275					280					285			
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser
	290					295					300				
Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
305					310					315					320
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
				325					330					335	
Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
			340					345					350		
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
		355					360					365			

ES 2 595 638 T3

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 241

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 241

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Ile Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Asp Gln Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Asp Gly Pro Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

ES 2 595 638 T3

Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala
130						135					140				
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
145					150					155					160
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
				165					170					175	
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
			180					185					190		
Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His
		195					200					205			
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Ser	Cys
210					215						220				
Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val
225					230					235					240
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
				245					250					255	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
			260					265					270		
Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
		275					280					285			
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser
290						295					300				
Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
305					310					315					320
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
				325					330					335	
Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
			340					345					350		
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
		355					360					365			

ES 2 595 638 T3

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 242

<211> 214

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 242

5

ES 2 595 638 T3

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	1	5	10	15
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Thr	Ser	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ser	Phe	20	25	30	
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	35	40	45	
Tyr	Asn	Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Lys	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	50	55	60	
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	65	70	75	80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	His	Tyr	Glu	Ser	Pro	Leu	85	90	95	
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	100	105	110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	115	120	125	
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	130	135	140	
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	145	150	155	160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	180	185	190	
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	195	200	205	
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	210													

<210> 243
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

ES 2 595 638 T3

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 243

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Thr Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Phe
          20           25           30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

Tyr Asn Ala Gln Thr Glu Ala Gln Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Glu Ser Pro Leu
          85           90           95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
          100          105          110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

```

ES 2 595 638 T3

115

120

125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 244

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 244

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Ile Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

ES 2 595 638 T3

Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Asp Gly Pro Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys
210 215 220

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

ES 2 595 638 T3

340

345

350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 245

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 245

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Ile Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Gln Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

ES 2 595 638 T3

Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Asp Gly Pro Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys
210 215 220

Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro

ES 2 595 638 T3

340

345

350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 246

<211> 514

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 246

Met Met Trp Thr Trp Ala Leu Trp Met Leu Pro Ser Leu Cys Lys Phe
1 5 10 15

Ser Leu Ala Ala Leu Pro Ala Lys Pro Glu Asn Ile Ser Cys Val Tyr
20 25 30

Tyr Tyr Arg Lys Asn Leu Thr Cys Thr Trp Ser Pro Gly Lys Glu Thr
35 40 45

Ser Tyr Thr Gln Tyr Thr Val Lys Arg Thr Tyr Ala Phe Gly Glu Lys
50 55 60

His Asp Asn Cys Thr Thr Asn Ser Ser Thr Ser Glu Asn Arg Ala Ser
65 70 75 80

Cys Ser Phe Phe Leu Pro Arg Ile Thr Ile Pro Asp Asn Tyr Thr Ile
85 90 95

Glu Val Glu Ala Glu Asn Gly Asp Gly Val Ile Lys Ser His Met Thr
100 105 110

5

10

ES 2 595 638 T3

Tyr Trp Arg Leu Glu Asn Ile Ala Lys Thr Glu Pro Pro Lys Ile Phe
 115 120 125
 Arg Val Lys Pro Val Leu Gly Ile Lys Arg Met Ile Gln Ile Glu Trp
 130 135 140
 Ile Lys Pro Glu Leu Ala Pro Val Ser Ser Asp Leu Lys Tyr Thr Leu
 145 150 155 160
 Arg Phe Arg Thr Val Asn Ser Thr Ser Trp Met Glu Val Asn Phe Ala
 165 170 175
 Lys Asn Arg Lys Asp Lys Asn Gln Thr Tyr Asn Leu Thr Gly Leu Gln
 180 185 190
 Pro Phe Thr Glu Tyr Val Ile Ala Leu Arg Cys Ala Val Lys Glu Ser
 195 200 205
 Lys Phe Trp Ser Asp Trp Ser Gln Glu Lys Met Gly Met Thr Glu Glu
 210 215 220
 Glu Ala Pro Cys Gly Leu Glu Leu Trp Arg Val Leu Lys Pro Ala Glu
 225 230 235 240
 Ala Asp Gly Arg Arg Pro Val Arg Leu Leu Trp Lys Lys Ala Arg Gly
 245 250 255
 Ala Pro Val Leu Glu Lys Thr Leu Gly Tyr Asn Ile Trp Tyr Tyr Pro
 260 265 270
 Glu Ser Asn Thr Asn Leu Thr Glu Thr Met Asn Thr Thr Asn Gln Gln
 275 280 285
 Leu Glu Leu His Leu Gly Gly Glu Ser Phe Trp Val Ser Met Ile Ser
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Leu Gly Lys Ser Pro Val Ala Thr Leu Arg Ile Pro Ala
 305 310 315 320
 Ile Gln Glu Lys Ser Phe Gln Cys Ile Glu Val Met Gln Ala Cys Val
 325 330 335
 Ala Glu Asp Gln Leu Val Val Lys Trp Gln Ser Ser Ala Leu Asp Val
 340 345 350

ES 2 595 638 T3

Asn Thr Trp Met Ile Glu Trp Phe Pro Asp Val Asp Ser Glu Pro Thr
355 360 365

Thr Leu Ser Trp Glu Ser Val Ser Gln Ala Thr Asn Trp Thr Ile Gln
370 375 380

Gln Asp Lys Leu Lys Pro Phe Trp Cys Tyr Asn Ile Ser Val Tyr Pro
385 390 395 400

Met Leu His Asp Lys Val Gly Glu Pro Tyr Ser Ile Gln Ala Tyr Ala
405 410 415

Lys Glu Gly Val Pro Ser Glu Gly Pro Glu Thr Lys Val Glu Asn Ile
420 425 430

Gly Val Lys Thr Val Thr Ile Thr Trp Lys Glu Ile Pro Lys Ser Glu
435 440 445

Arg Lys Gly Ile Ile Cys Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Gln Ala Glu Gly
450 455 460

Gly Lys Gly Phe Ser Lys Thr Val Asn Ser Ser Ile Leu Gln Tyr Gly
465 470 475 480

Leu Glu Ser Leu Lys Arg Lys Thr Ser Tyr Ile Val Gln Val Met Ala
485 490 495

Ser Thr Ser Ala Gly Gly Thr Asn Gly Thr Ser Ile Asn Phe Lys Thr
500 505 510

Leu Ser

REIVINDICACIONES

1. Un método para controlar la farmacocinética en plasma de un anticuerpo IgG conservando al mismo tiempo la actividad de unión a antígeno de la región variable, comprendiendo dicho método modificar la carga de al menos un resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de una región determinante de complementariedad (CDR) del anticuerpo, en el que el resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de la región CDR es al menos un resto de aminoácido seleccionado de restos de aminoácidos en las posiciones 31, 61, 62, 64 y 65 en la región variable de cadena pesada y posiciones 24, 27, 53, 54 y 55 en la región variable de cadena ligera de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat.
2. Un método para producir un anticuerpo IgG cuya farmacocinética en plasma se controla conservando al mismo tiempo la actividad de unión a antígeno de la región variable, comprendiendo dicho método:
 - (a) modificar un ácido nucleico que codifica un anticuerpo IgG para modificar la carga de al menos un resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de la región CDR del anticuerpo, en el que el resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de la región CDR es al menos un resto de aminoácido seleccionado de los restos de aminoácidos en las posiciones 31, 61, 62, 64 y 65 en la región variable de cadena pesada y las posiciones 24, 27, 53, 54 y 55 en la región variable de cadena ligera de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat;
 - (b) cultivar una célula hospedadora para expresar el ácido nucleico; y
 - (c) recoger el anticuerpo del cultivo de células hospedadoras.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo multispecífico que se une con al menos dos tipos de antígenos.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para controlar la farmacocinética en plasma de un anticuerpo IgG o para producir un anticuerpo IgG cuya farmacocinética en plasma está controlada, en el que el control de la farmacocinética se refiere al aumento o la reducción de uno cualquiera de los parámetros de eliminación (CL) en plasma, área bajo la curva de concentración (ABC), tiempo de conservación medio en plasma y semivida en plasma ($t_{1/2}$).
6. Un método para producir un anticuerpo IgG multispecífico cuya farmacocinética en plasma está controlada conservando al mismo tiempo la actividad de unión a antígeno de la región variable, comprendiendo dicho anticuerpo un primer polipéptido y un segundo polipéptido cada uno de los cuales comprende una región variable de anticuerpo, comprendiendo dicho método:
 - (a) modificar un ácido nucleico que codifica el primer y/o segundo polipéptido para modificar la carga de al menos un resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de la región CDR del primer polipéptido y/o segundo polipéptido, en el que uno o ambos de un ácido nucleico que codifica los restos de aminoácidos del primer polipéptido y un ácido nucleico que codifica los restos de aminoácidos del segundo polipéptido se modifican, para aumentar la diferencia entre los puntos isoeléctricos del primer polipéptido y/o segundo polipéptido en comparación con dichos polipéptidos antes de la modificación, y en el que el resto de aminoácido que puede exponerse en la superficie de la región CDR es al menos un resto de aminoácido seleccionado de restos de aminoácidos en las posiciones 31, 61, 62, 64 y 65 en la región variable de cadena pesada y las posiciones 24, 27, 53, 54 y 55 en la región variable de cadena ligera de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat;
 - (b) cultivar una célula hospedadora para expresar los ácidos nucleicos; y
 - (c) recoger un anticuerpo multispecífico del cultivo de células hospedadoras.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la etapa de recoger el anticuerpo IgG multispecífico que comprende el primer polipéptido y segundo polipéptido del cultivo de células hospedadoras se consigue por una cromatografía convencional.
8. El método de la reivindicación 6 o 7, en el que el ácido nucleico se modifica de modo que los picos para homomultímero del primer polipéptido, homomultímero del segundo polipéptido y heteromultímero del primer polipéptido y segundo polipéptido estén más claramente separados en un análisis cromatográfico convencional en comparación con los de dichos polipéptidos antes de la modificación.

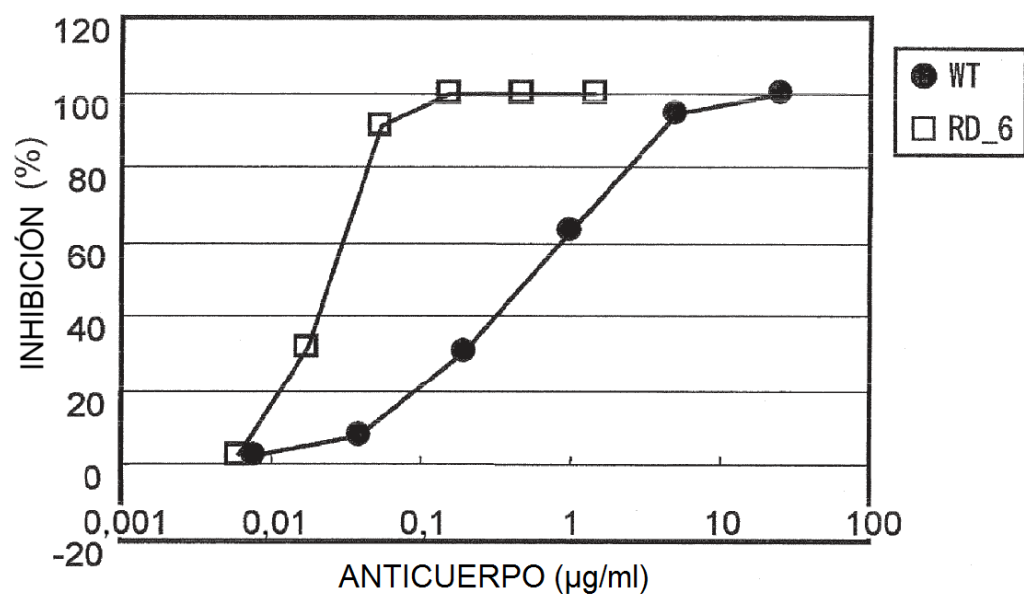


FIG. 1

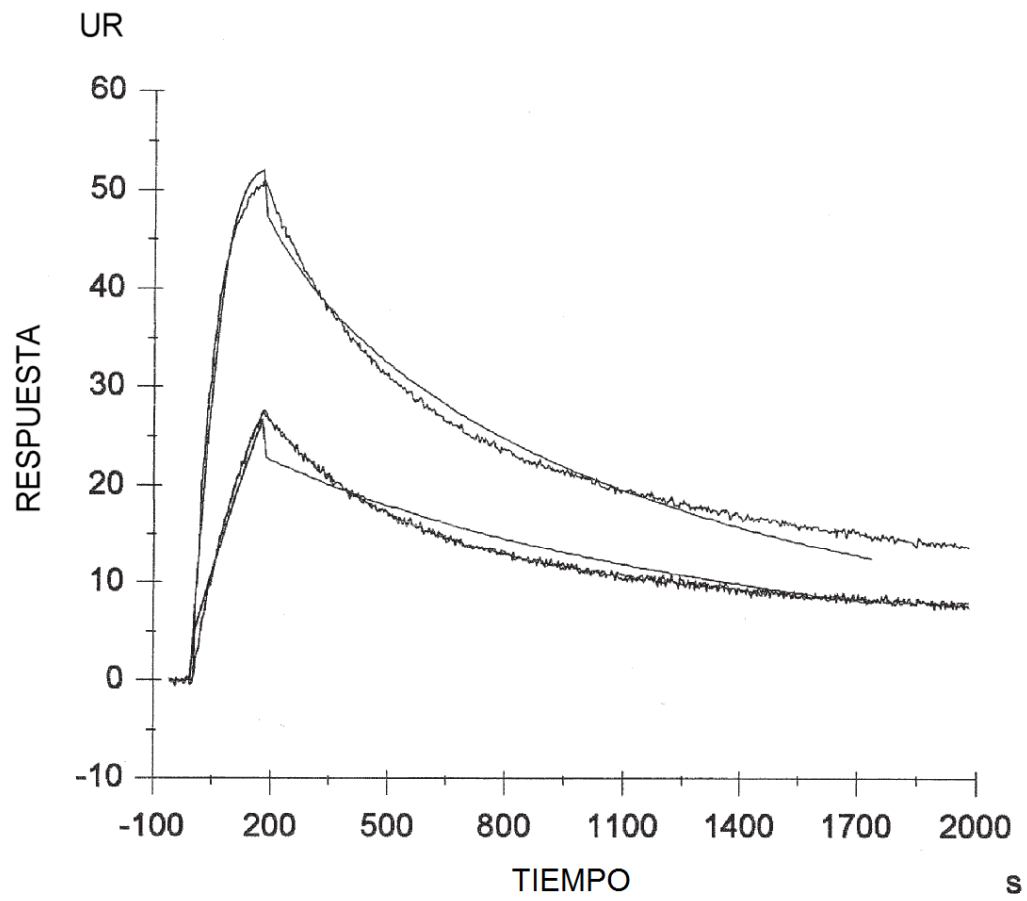


FIG. 2

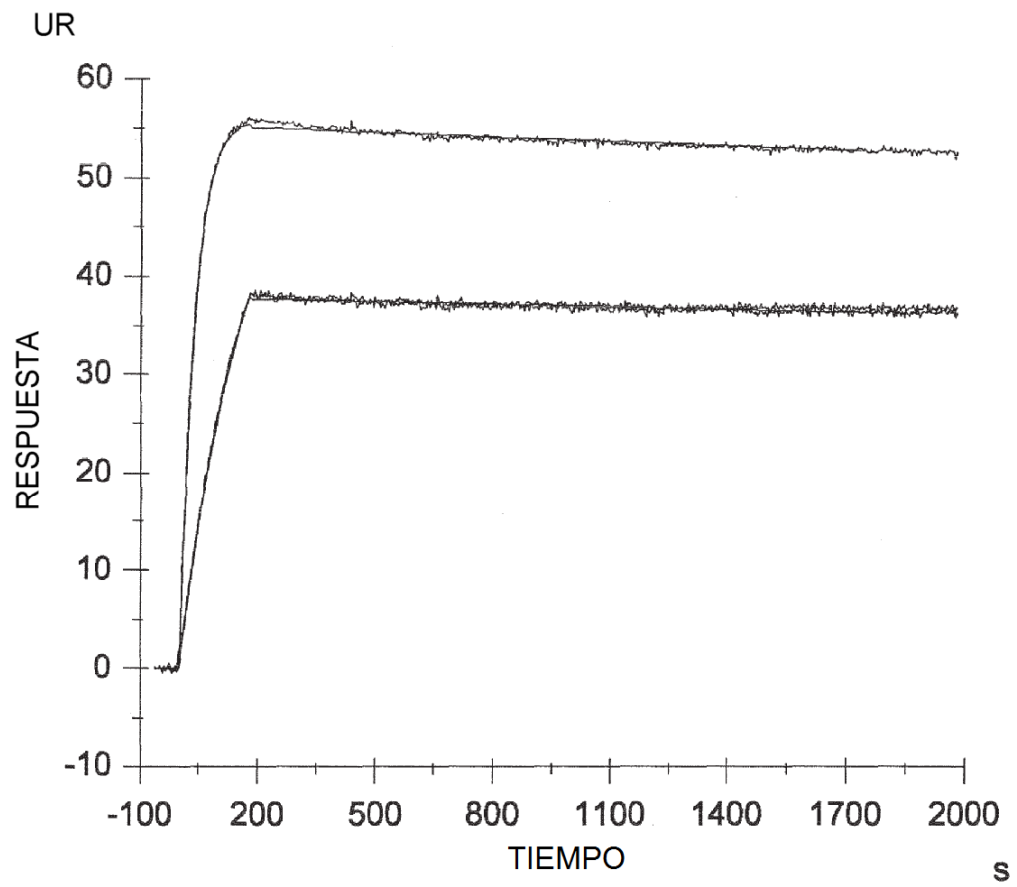


FIG. 3

	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
WT	SDHWS (SEQ ID NO: 1)	YISYSGITTYNPSLKS (SEQ ID NO: 2)	SLARTTAMDY (SEQ ID NO: 3)	RASQDTSSYLN (SEQ ID NO: 4)	YTSRLHS (SEQ ID NO: 5)	QQGNTLPYT (SEQ ID NO: 6)
RD_68	WDHWS (SEQ ID NO: 26)					
RD_12		YISYSGITSYNPSLKS (SEQ ID NO: 44)				
RD_61		YISYSGITTYNPSLKS (SEQ ID NO: 45)				
RD_79		YISYSGIRTYPNPSLKS (SEQ ID NO: 43)				
RD_82		EISYSGITTYNPSLKS (SEQ ID NO: 42)				
RD_2			ILARTTAMDY (SEQ ID NO: 46)			
RD_3			SLARATAMDY (SEQ ID NO: 51)			
RD_4			VLARTTAMDY (SEQ ID NO: 47)			
RD_6			LLARATAMDY (SEQ ID NO: 57)			
RD_80			ILARTTAMDY (SEQ ID NO: 48)			
RD_78			SIARTTVLDY (SEQ ID NO: 65)			
RD_81			SLARTTAMDY (SEQ ID NO: 54)			
RD_83			SLARITAMDY (SEQ ID NO: 52)			
RD_84			SIARTTAMDY (SEQ ID NO: 50)			
RD_26			RASRDISSYLN (SEQ ID NO: 67)			QQSNTLPYT (SEQ ID NO: 75)
RD_72			RASQDISSFLN (SEQ ID NO: 69)			GGGNSLPYT (SEQ ID NO: 78)
RD_22						QQGNRLPYT (SEQ ID NO: 76)
RD_23						GGGNTLPYT (SEQ ID NO: 72)
RD_28						SGGNTLPYT (SEQ ID NO: 74)
RDC_15L						

FIG. 4-1

WT	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
	SDHAW	YISYSGITTYNPSLKS	SLARTTAMDY	RASQDISSYLN	YISRLHS	QQGNTLPYT
	(SEQ ID NO : 1)	(SEQ ID NO : 2)	(SEQ ID NO : 3)	(SEQ ID NO : 4)	(SEQ ID NO : 5)	(SEQ ID NO : 6)
RD_37	TDHAW (SEQ ID NO : 27)					
RD_8	DDHAW (SEQ ID NO : 28)					
RD_9	SDHALS (SEQ ID NO : 40)					
RD_11	NDHAW (SEQ ID NO : 29)					
RD_30	SDHAVS (SEQ ID NO : 41)					
RD_31	RDHAW (SEQ ID NO : 30)					
RD_32	VDHAW (SEQ ID NO : 31)					
RD_33	FDHAW (SEQ ID NO : 32)					
RD_34	ADHAW (SEQ ID NO : 33)					
RD_35	QDHAW (SEQ ID NO : 34)					
RD_36	YDHAW (SEQ ID NO : 35)					
RD_38	LDHAW (SEQ ID NO : 36)					
RD_42	HDHAW (SEQ ID NO : 37)					
RD_45	EDHAW (SEQ ID NO : 38)					
RD_46	GDHAW (SEQ ID NO : 39)					
RD_5			LLARTTAMDY (SEQ ID NO : 49)			
RD_18			EASQDISSYLN (SEQ ID NO : 66)			
RD_20			RASQDISSYLN (SEQ ID NO : 68)			
RD_27			RASQDISSYLS (SEQ ID NO : 70)			
RD_73			RASQDISSFLN (SEQ ID NO : 69)			
RD_29						QQGNTLPYT (SEQ ID NO : 73)
RDC_14H			SLARSTAMDY (SEQ ID NO : 53)			
PF_3H			SLARTTAMDY (SEQ ID NO : 55)			
PF_4H			SLARTTALDY (SEQ ID NO : 56)			

FIG. 4-2

	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
WT	SDHWS (SEQ ID NO: 1)	YISYSGITTNPSLKS (SEQ ID NO: 2)	SLARTTAMDY (SEQ ID NO: 3)	RASQDISSYLN (SEQ ID NO: 4)	YTSRLHS (SEQ ID NO: 5)	QQGNTLPYT (SEQ ID NO: 6)
RDC_2H			VLARATAMDY (SEQ ID NO: 58)			
RDC_3H			ILARATAMDY (SEQ ID NO: 59)			
RDC_4H			ILARATAMDY (SEQ ID NO: 60)			
RDC_5H			VLARITAMDY (SEQ ID NO: 61)			
RDC_6H			ILARITAMDY (SEQ ID NO: 62)			
RDC_7H			ILARITAMDY (SEQ ID NO: 63)			
RDC_8H			LLARITAMDY (SEQ ID NO: 64)			
RDC_27H		YISYSGITTNPSLKS (SEQ ID NO: 45)	LLARATAMDY (SEQ ID NO: 57)			
RDC_28H		YISYSGITTNPSLKS (SEQ ID NO: 45)	VLARATAMDY (SEQ ID NO: 58)			
RDC_30H		YISYSGITTNPSLKS (SEQ ID NO: 45)	ILARATAMDY (SEQ ID NO: 59)			
RDC_29H		YISYSGITTNPSLKS (SEQ ID NO: 45)	VLARITAMDY (SEQ ID NO: 61)			
RDC_32H		YISYSGITTNPSLKS (SEQ ID NO: 45)	ILARITAMDY (SEQ ID NO: 62)			
RDC_11L					GGGNRLPYT (SEQ ID NO: 79)	

FIG. 5

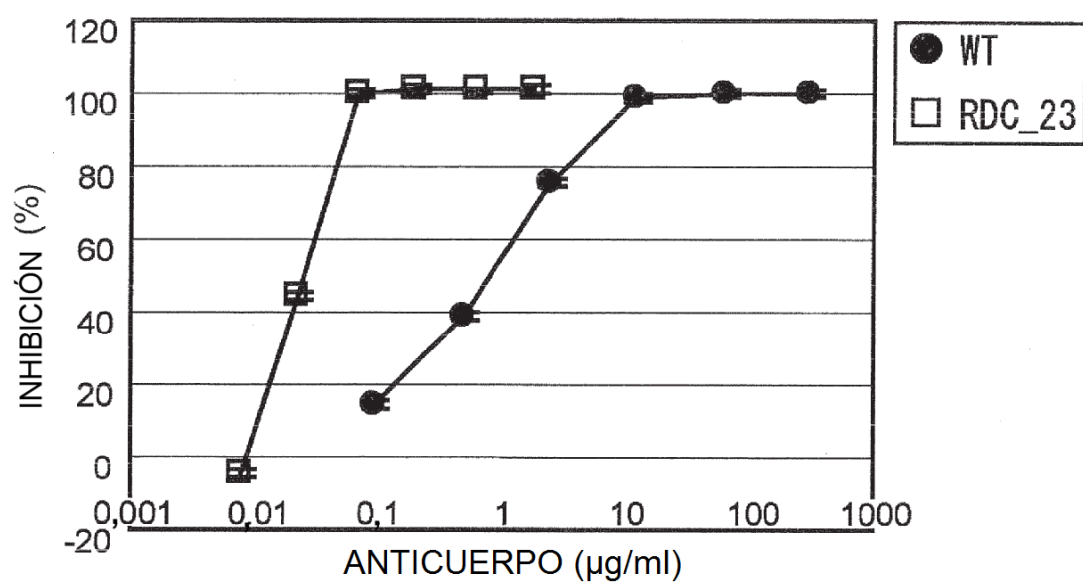


FIG. 6

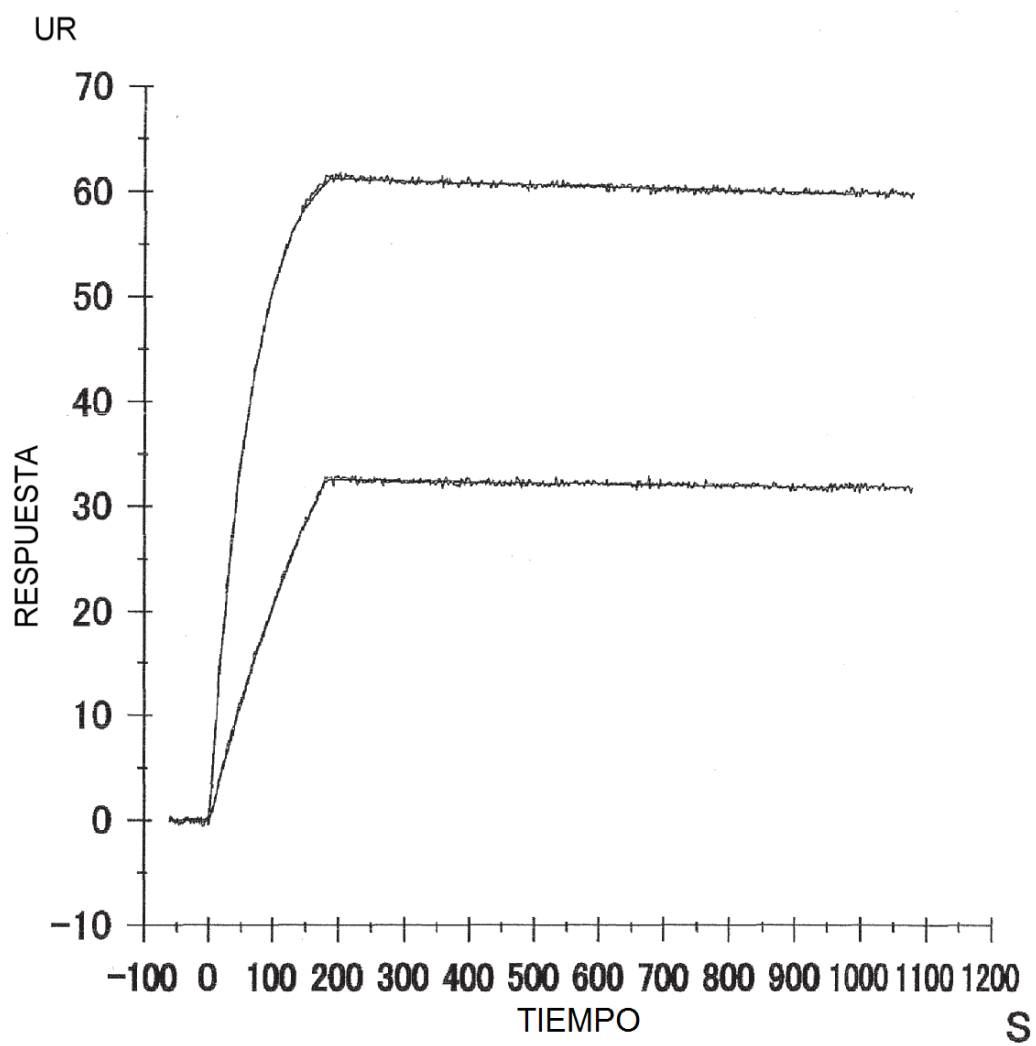


FIG. 7

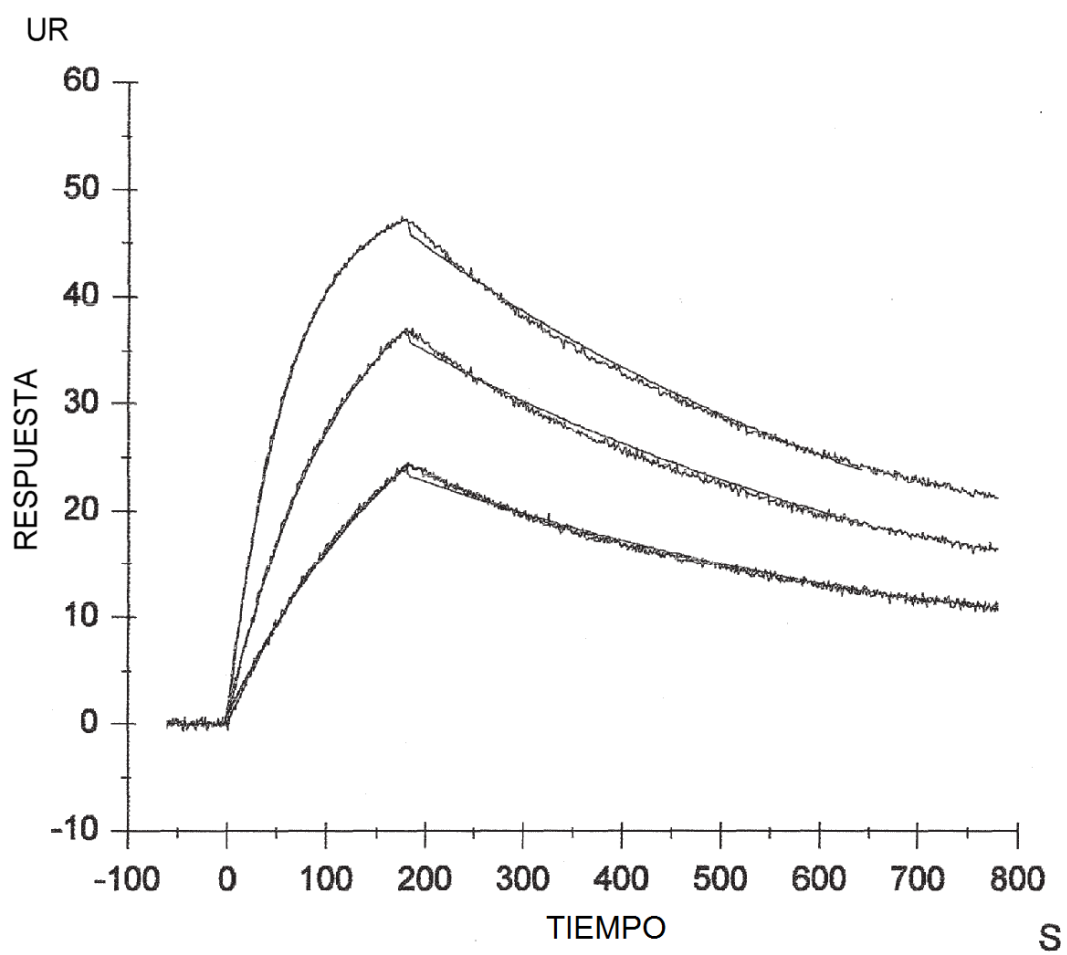


FIG. 8

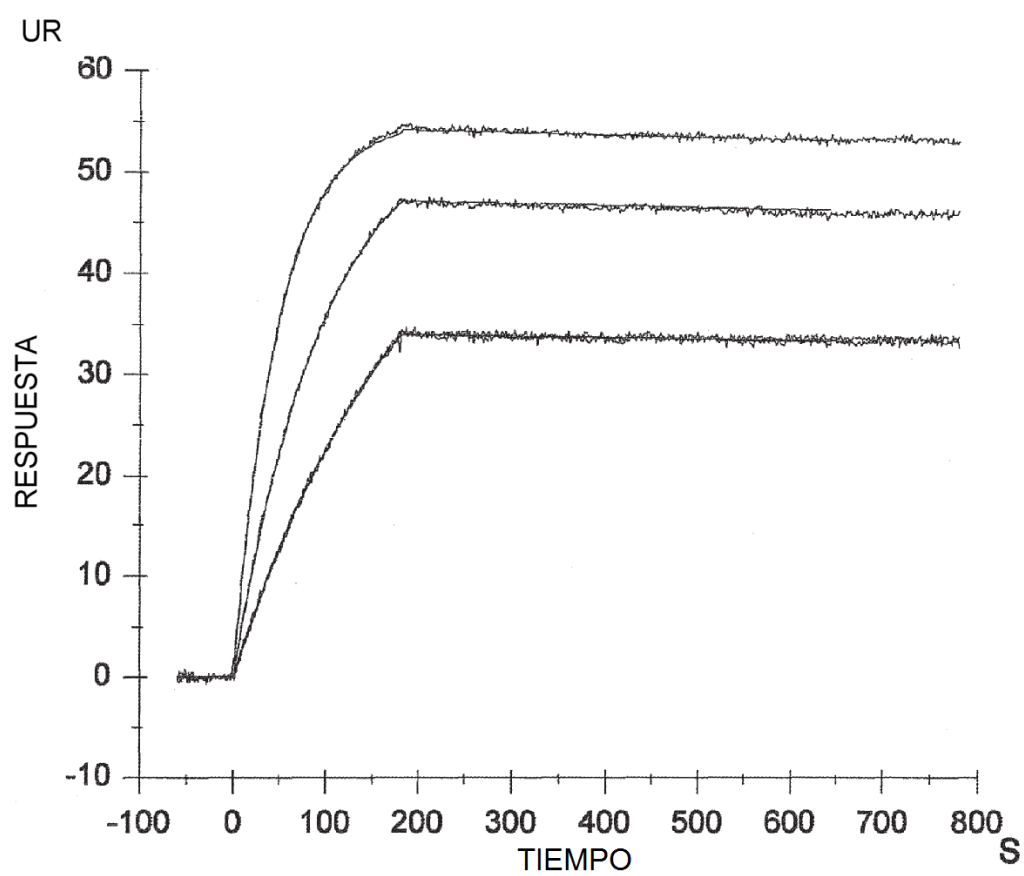


FIG. 9

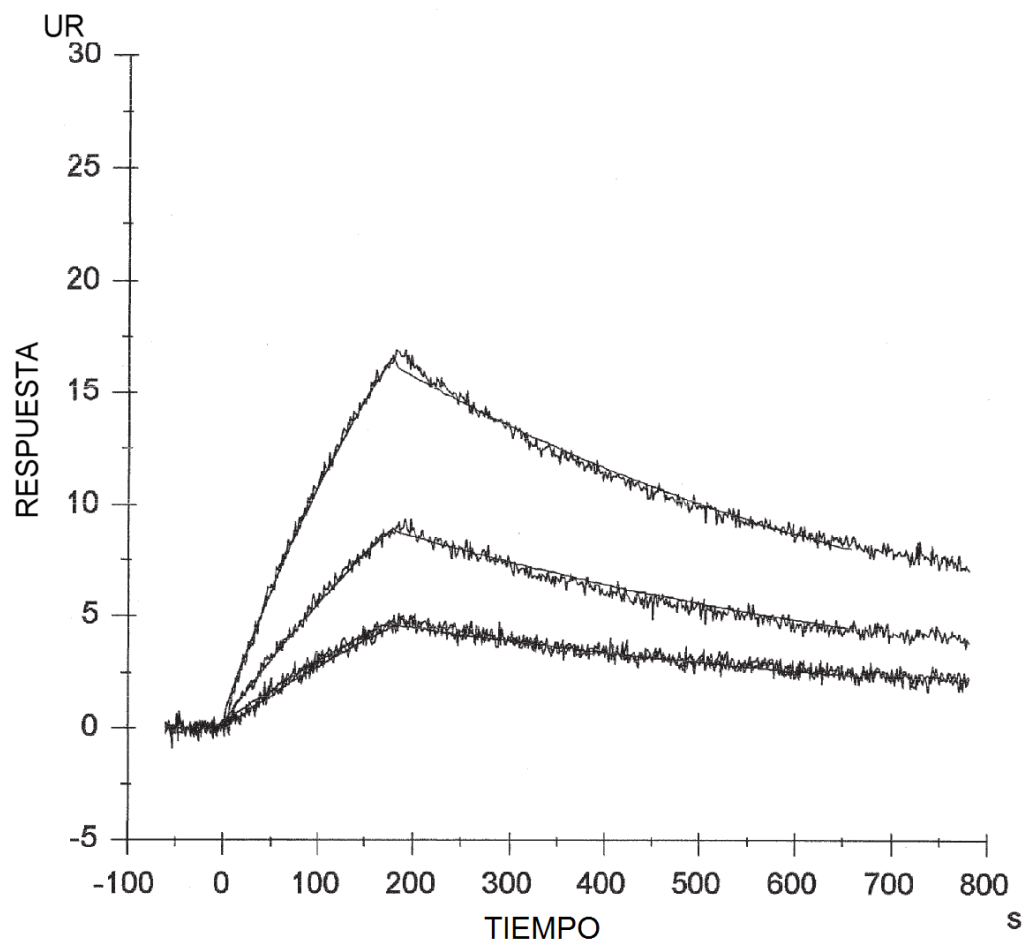


FIG. 10

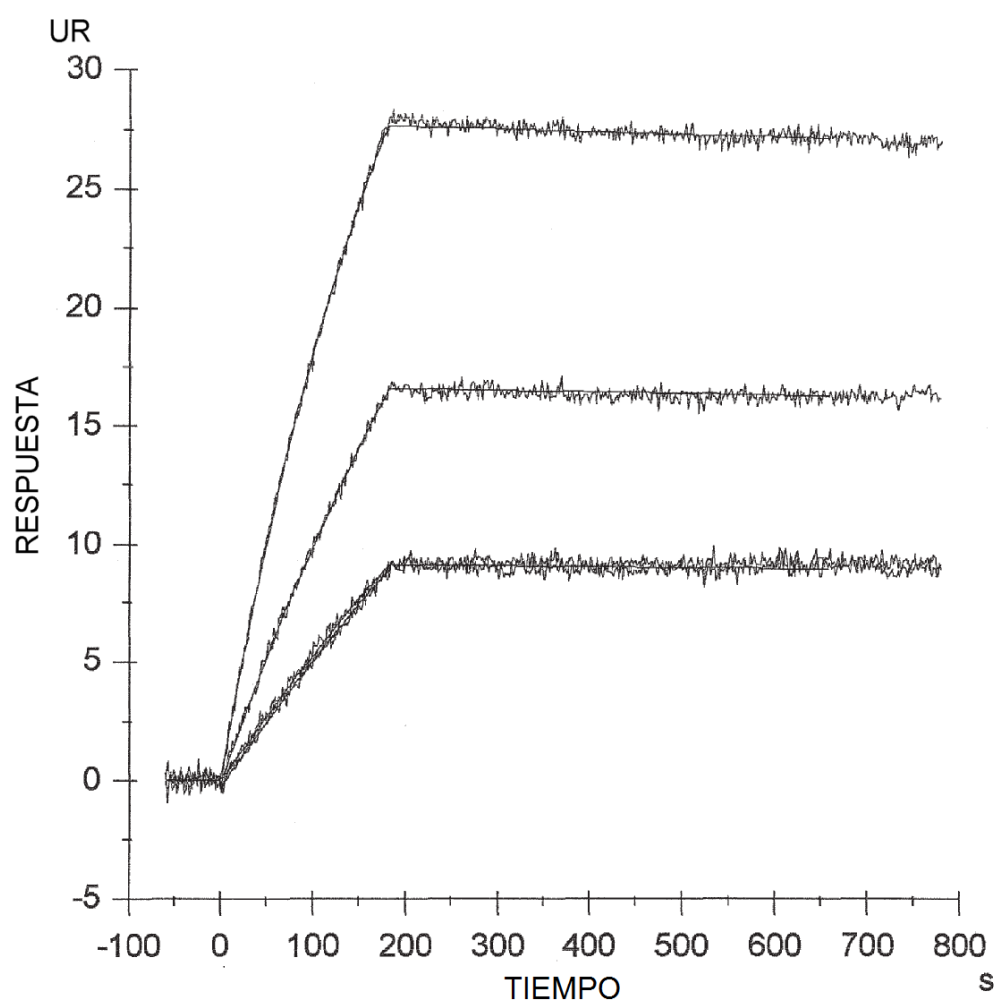


FIG. 11

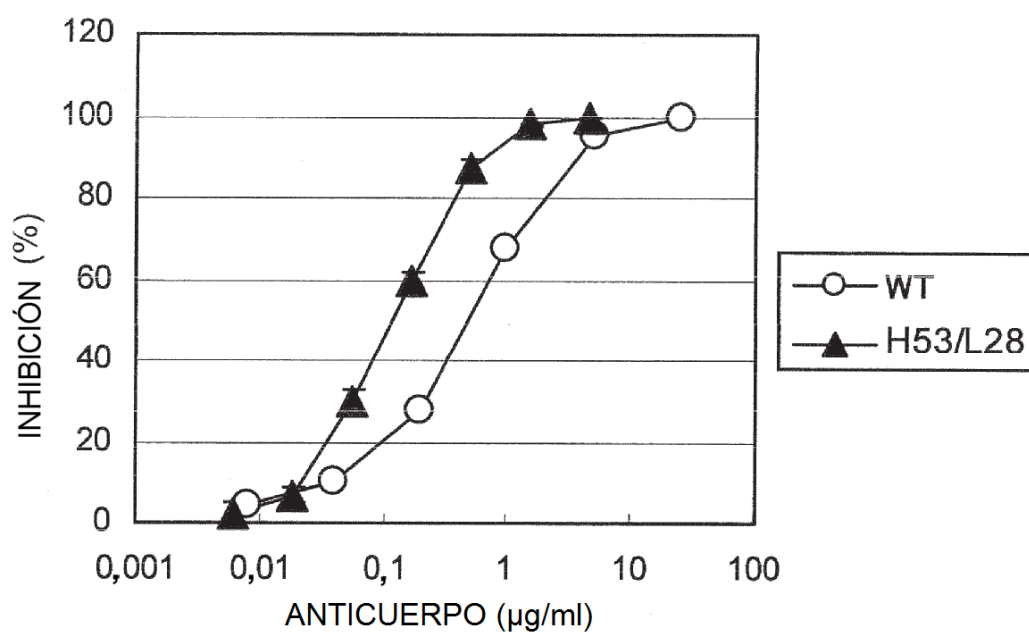


FIG. 12

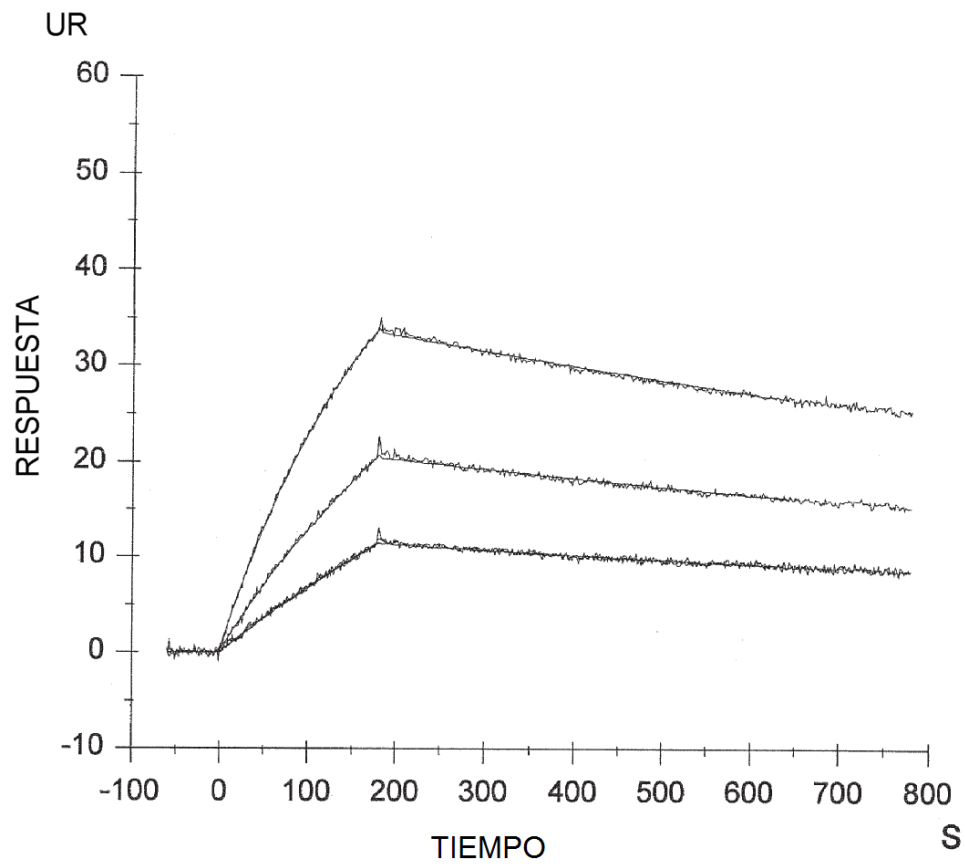


FIG. 13

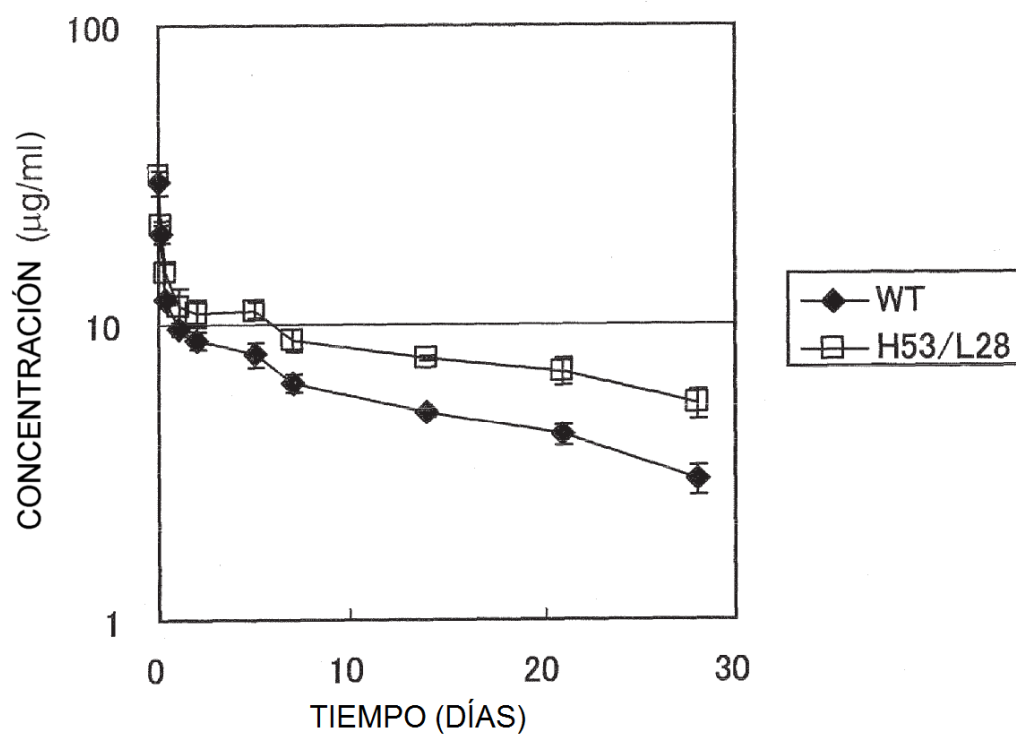


FIG. 14

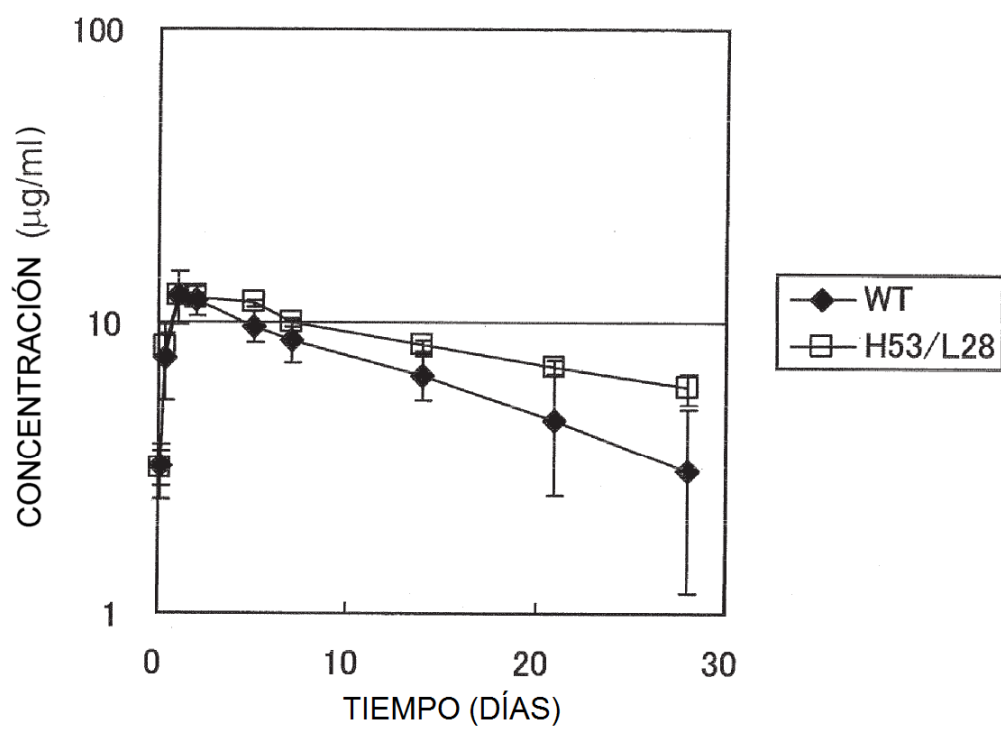


FIG. 15

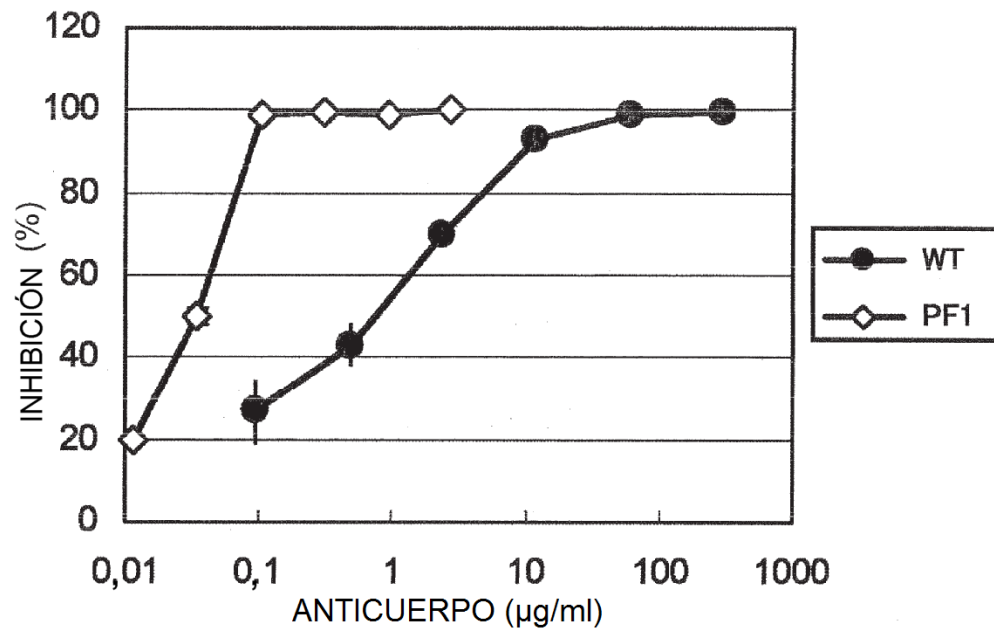


FIG. 16

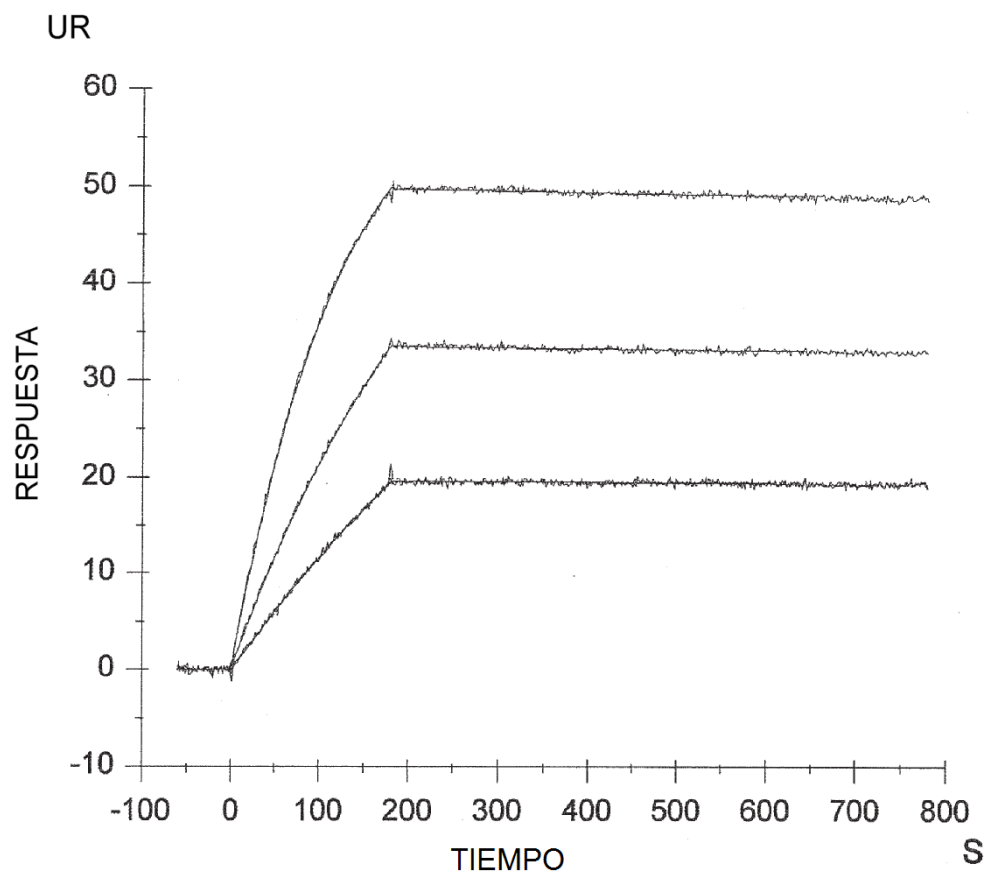


FIG. 17

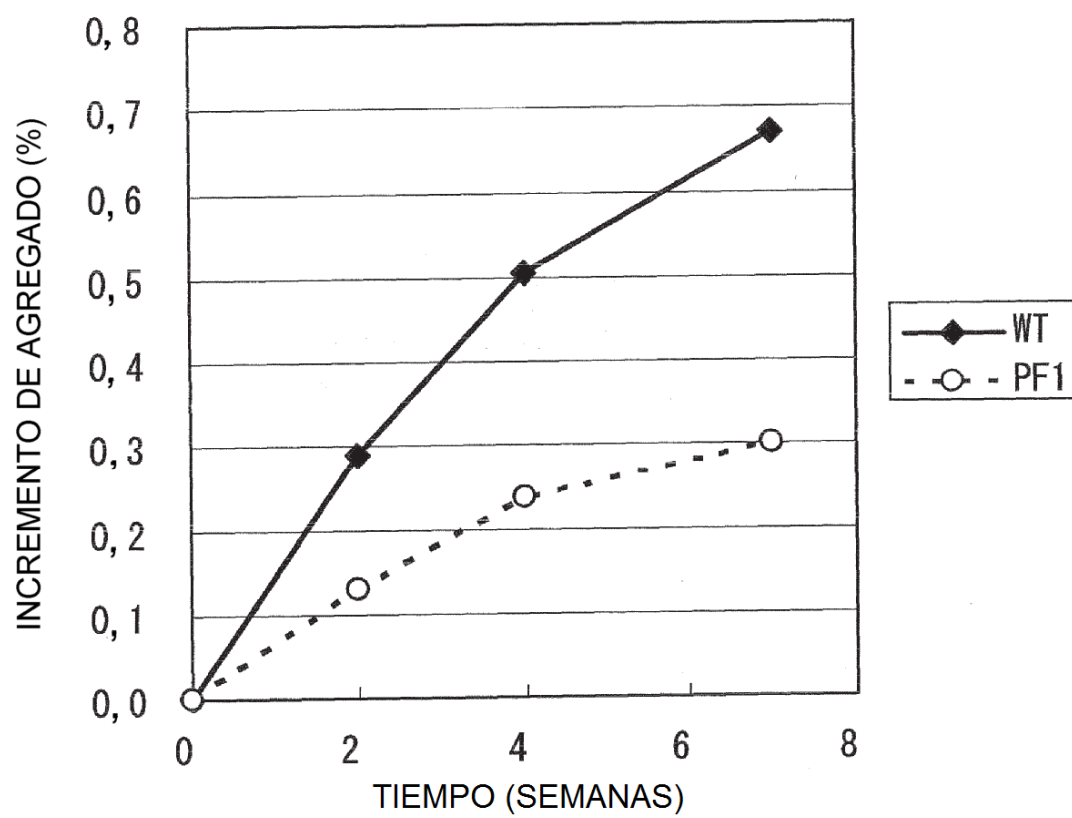


FIG. 18

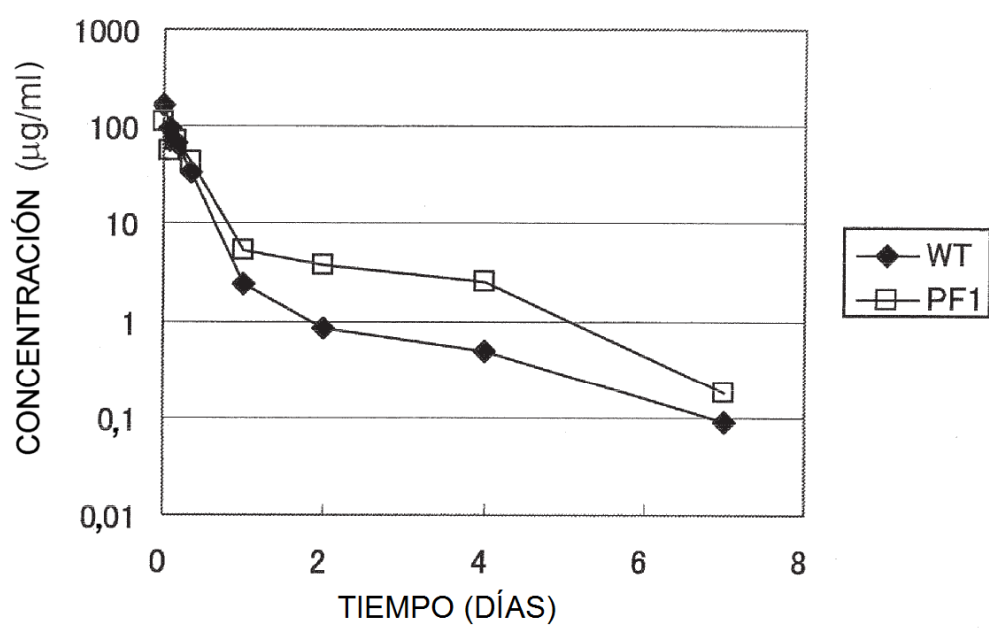


FIG. 19

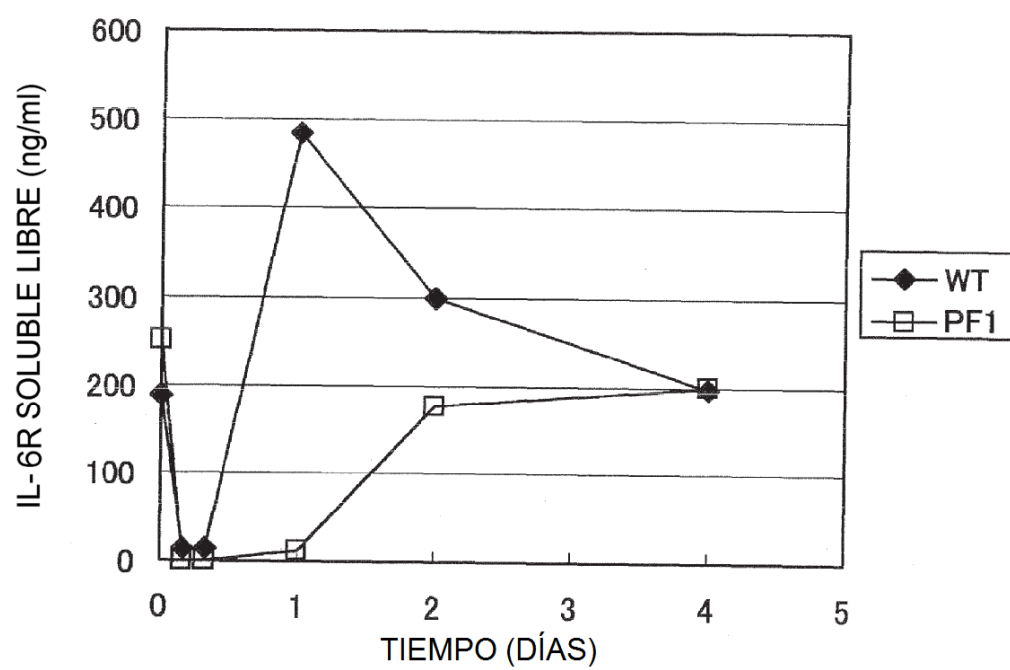


FIG. 20

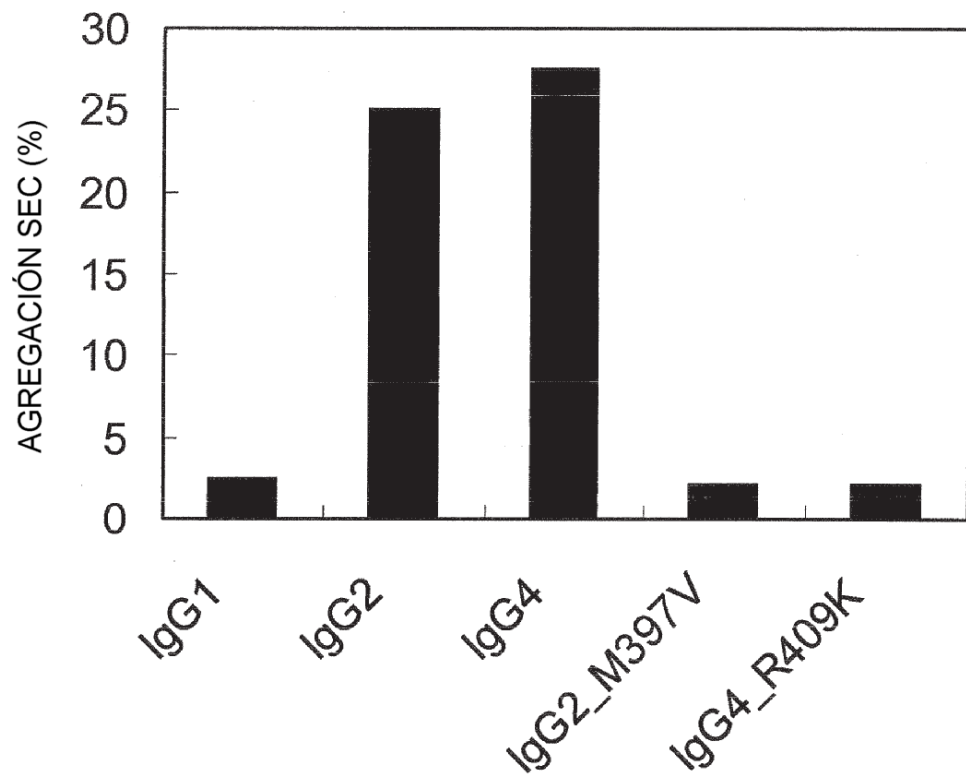


FIG. 21

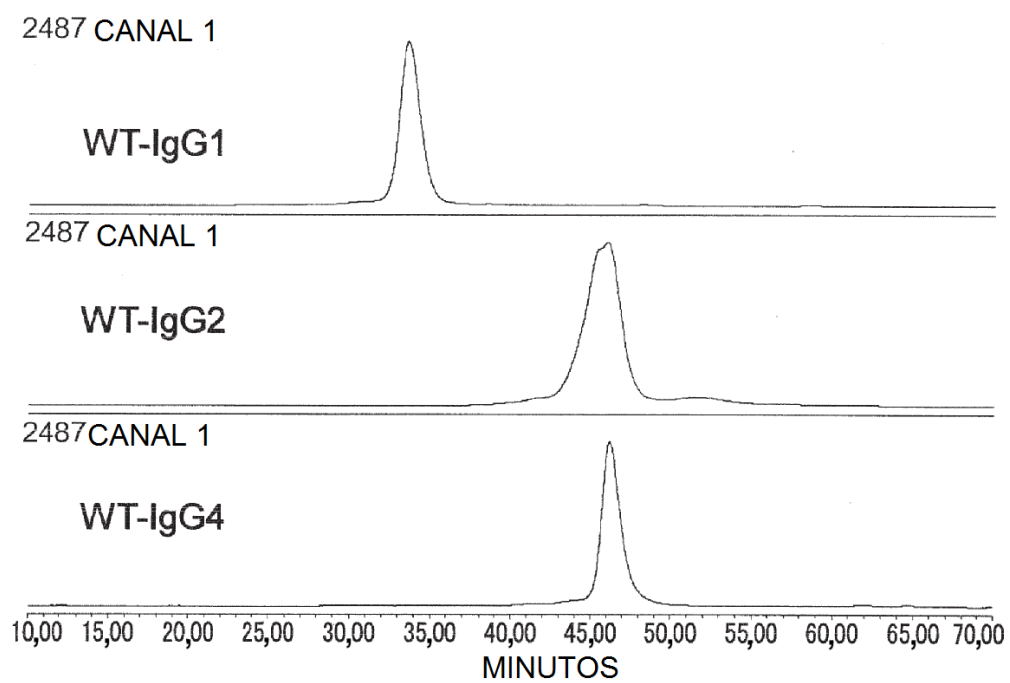


FIG. 22

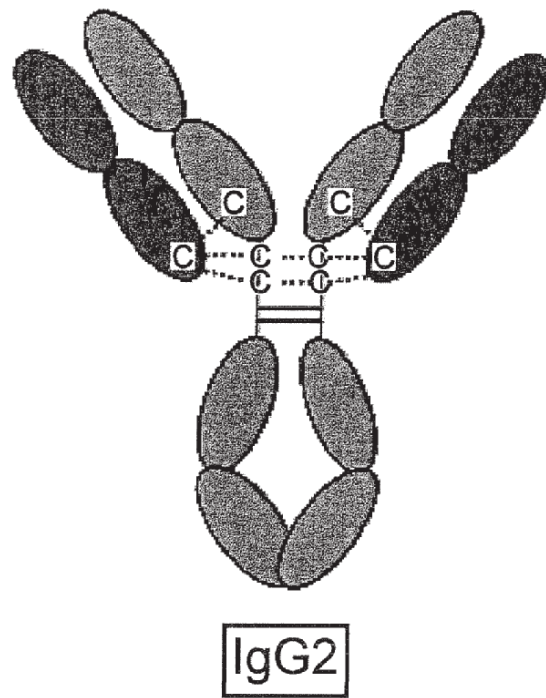


FIG. 23

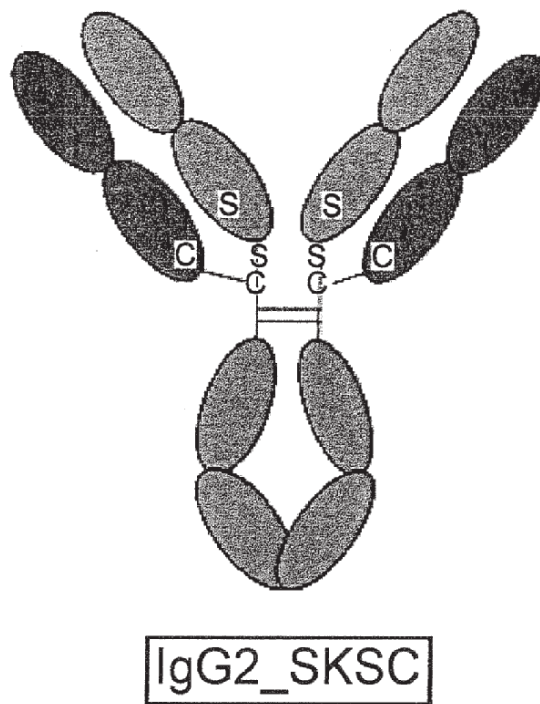


FIG. 24

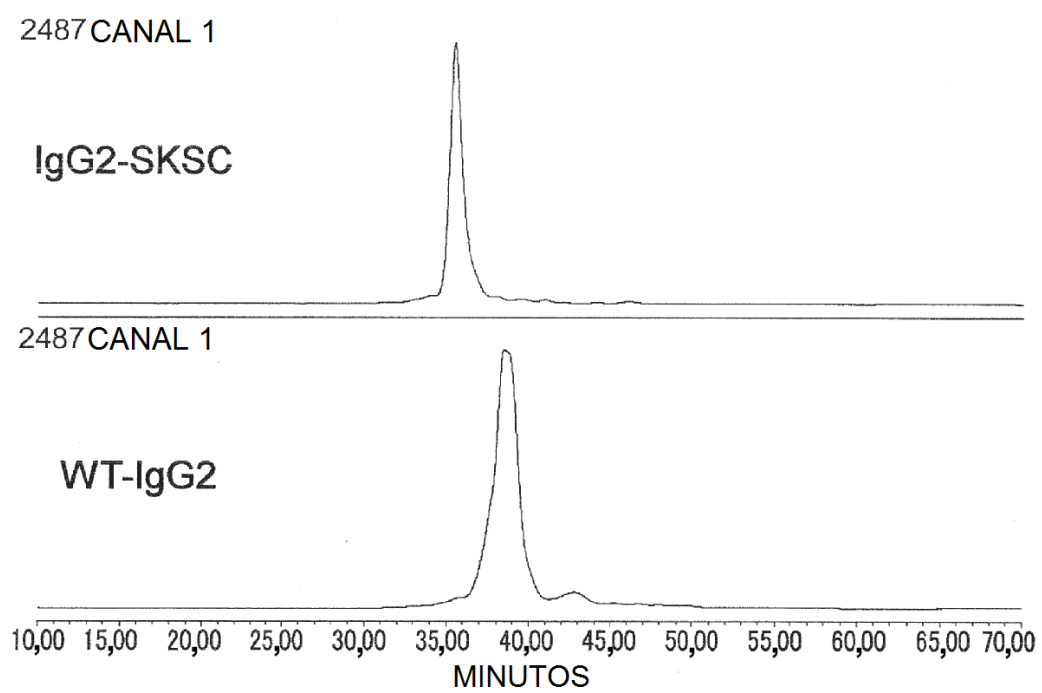


FIG. 25

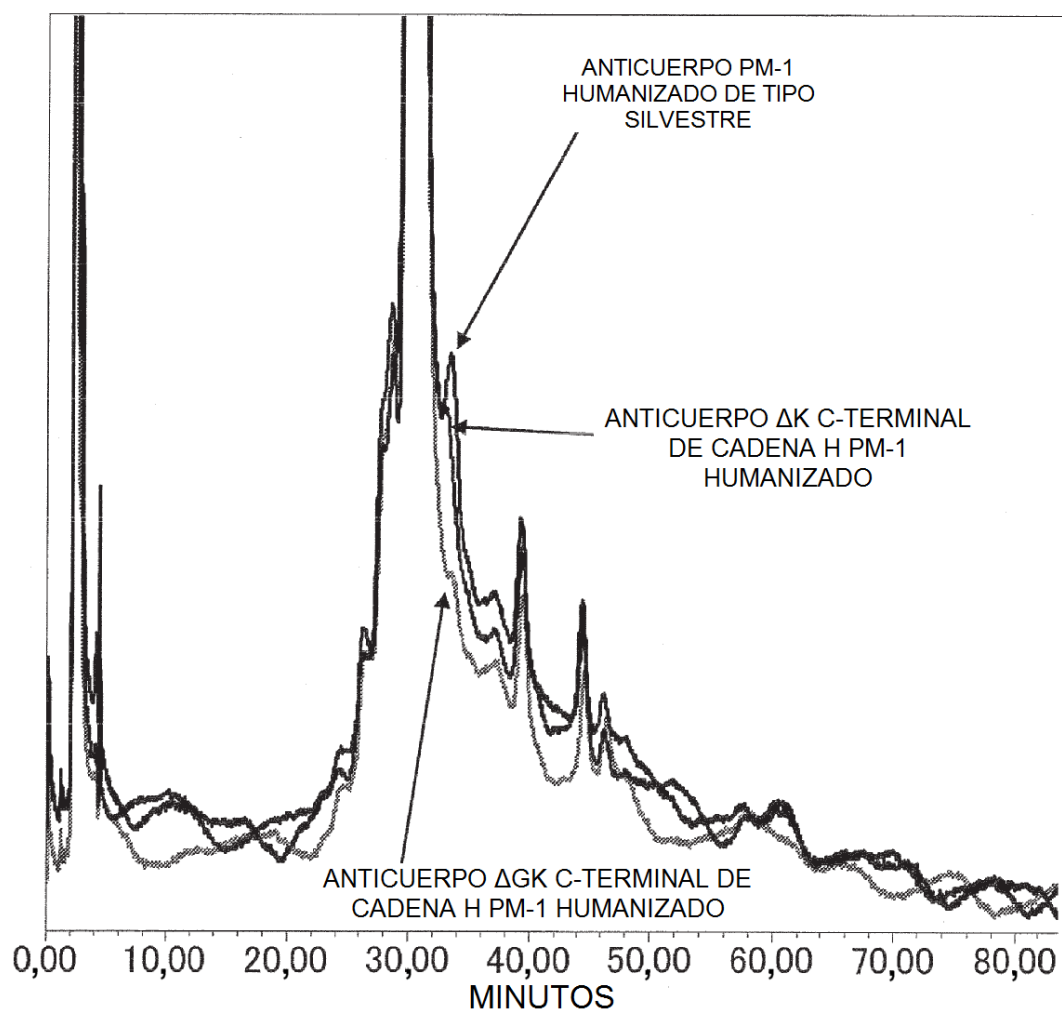
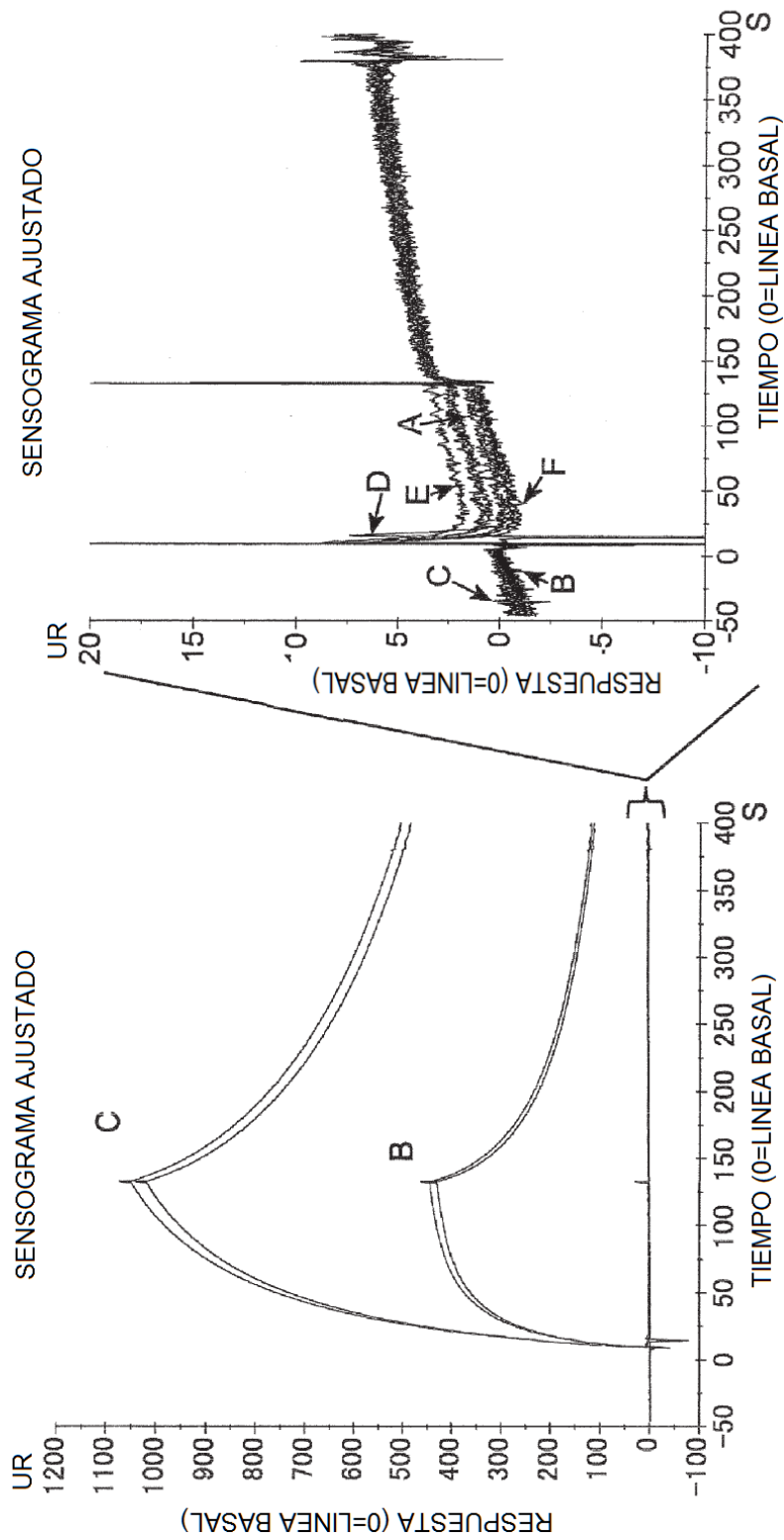


FIG. 26



A: M14ΔGK B: IgG4 C: IgG1 D: M11ΔGK E: IgG2 F: M17ΔGK

FIG. 27

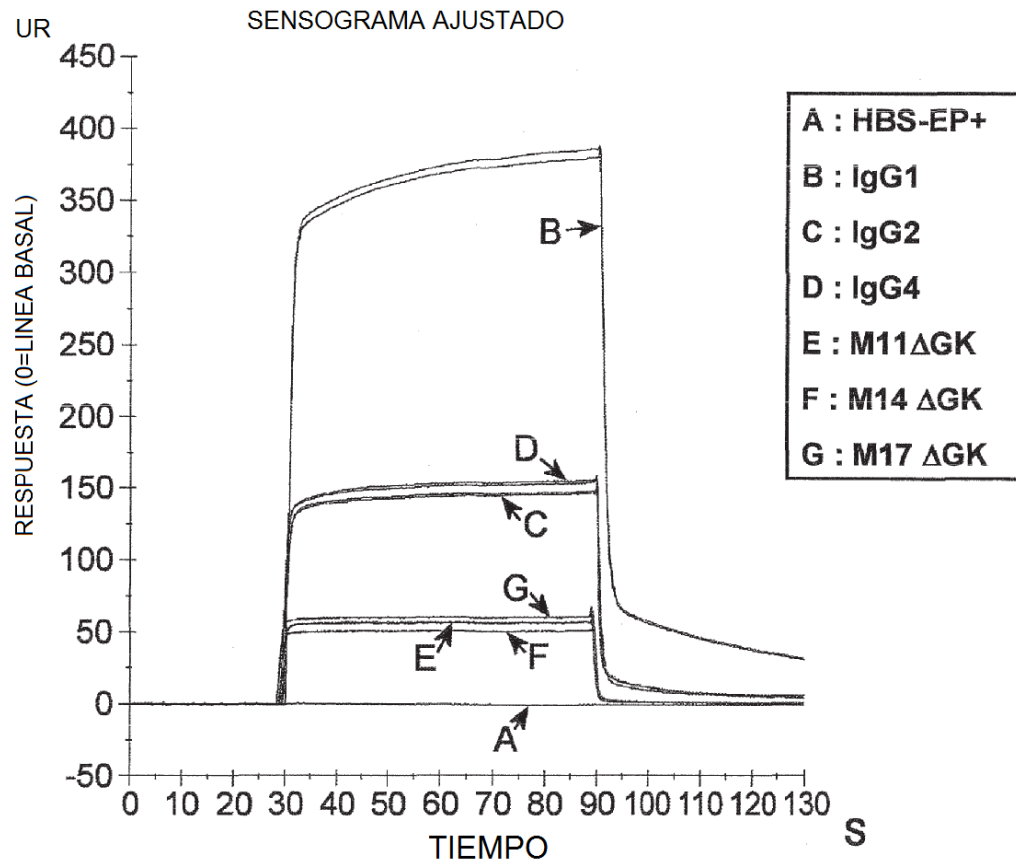


FIG. 28

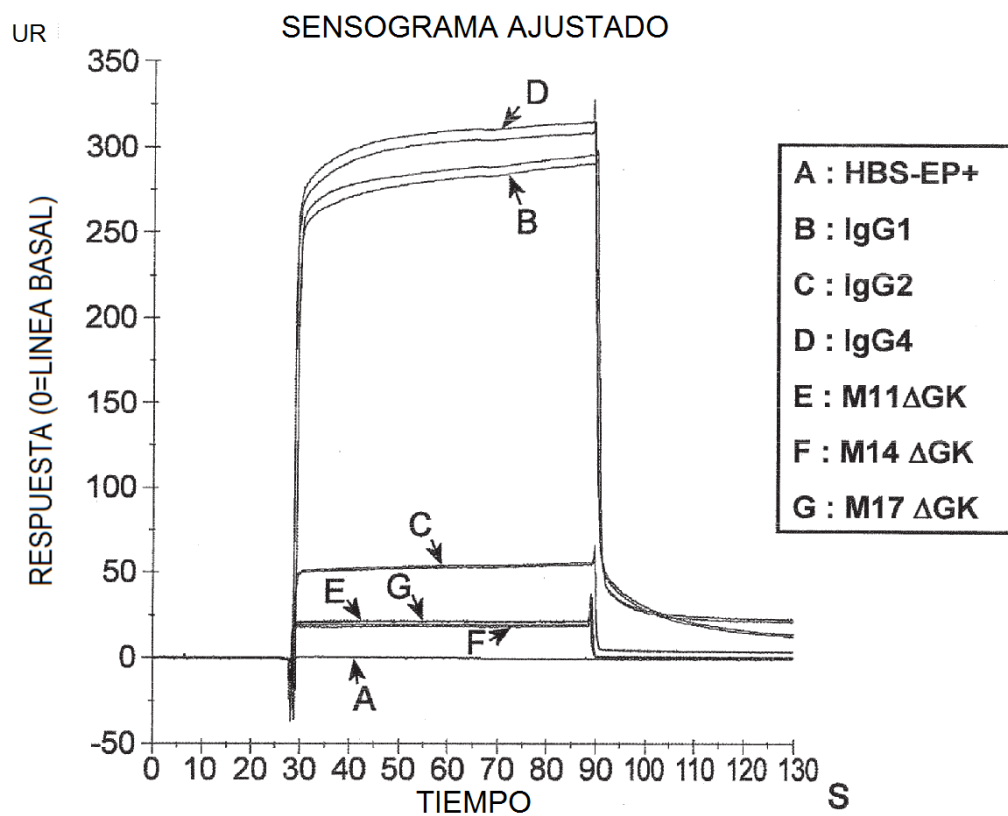


FIG. 29

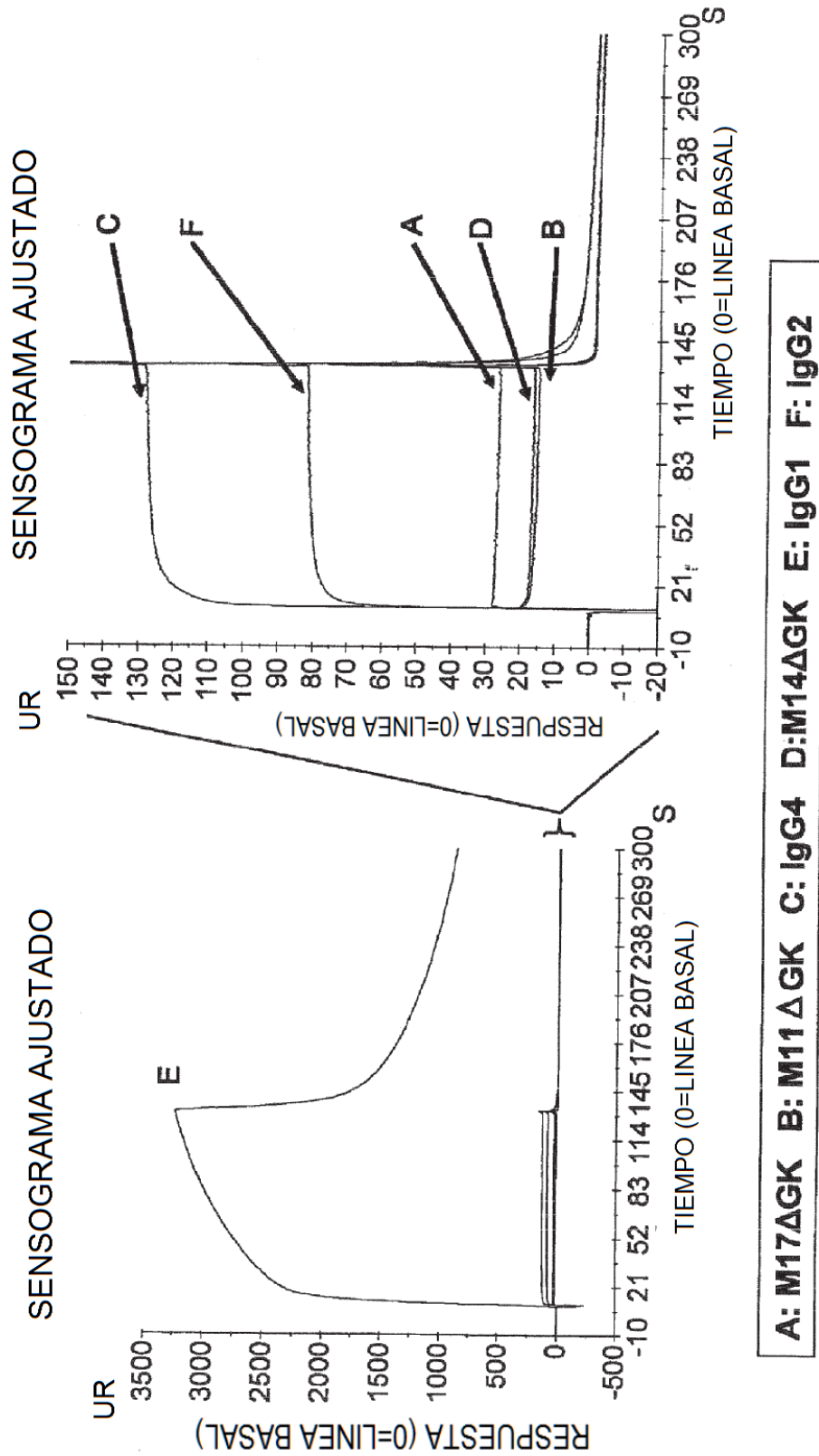


FIG. 30

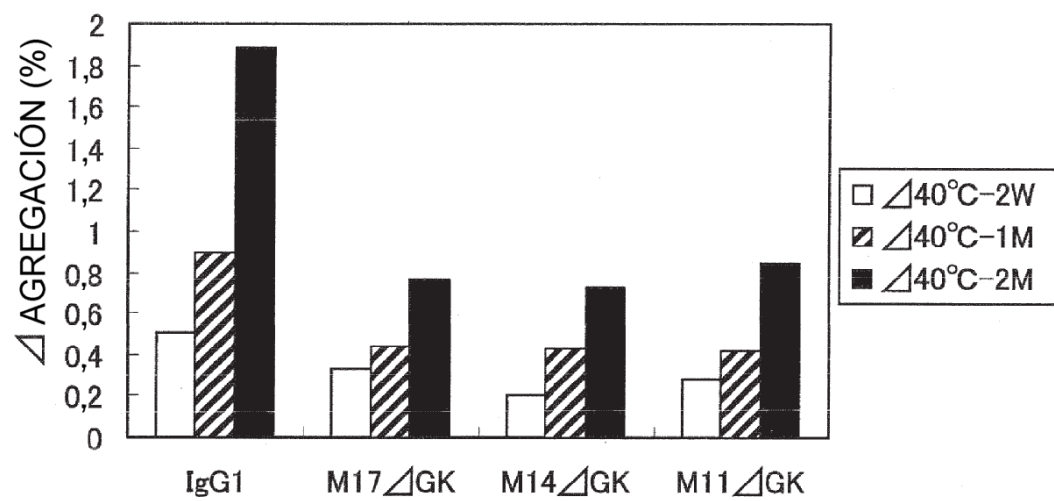


FIG. 31

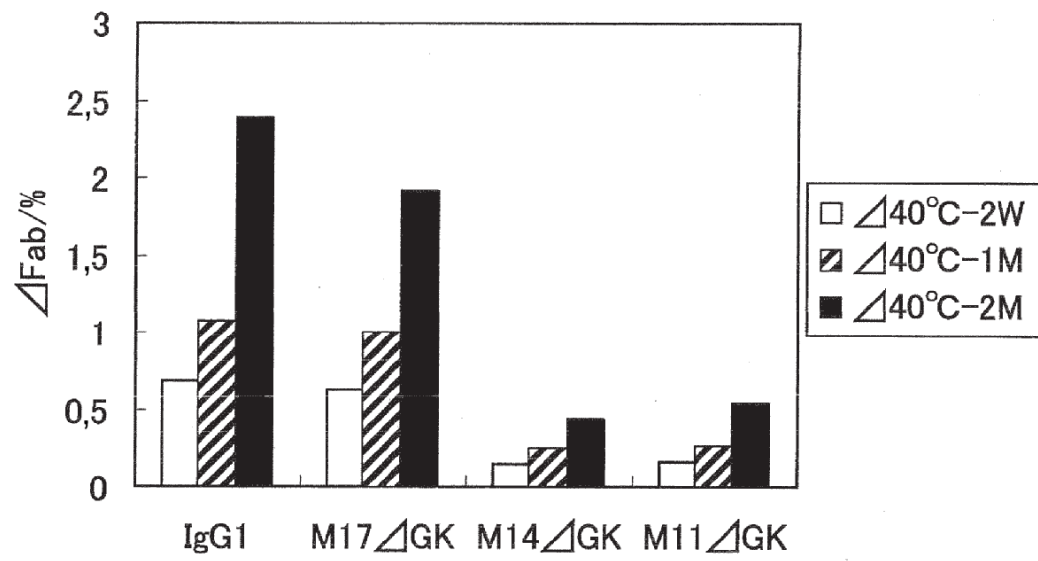


FIG. 32

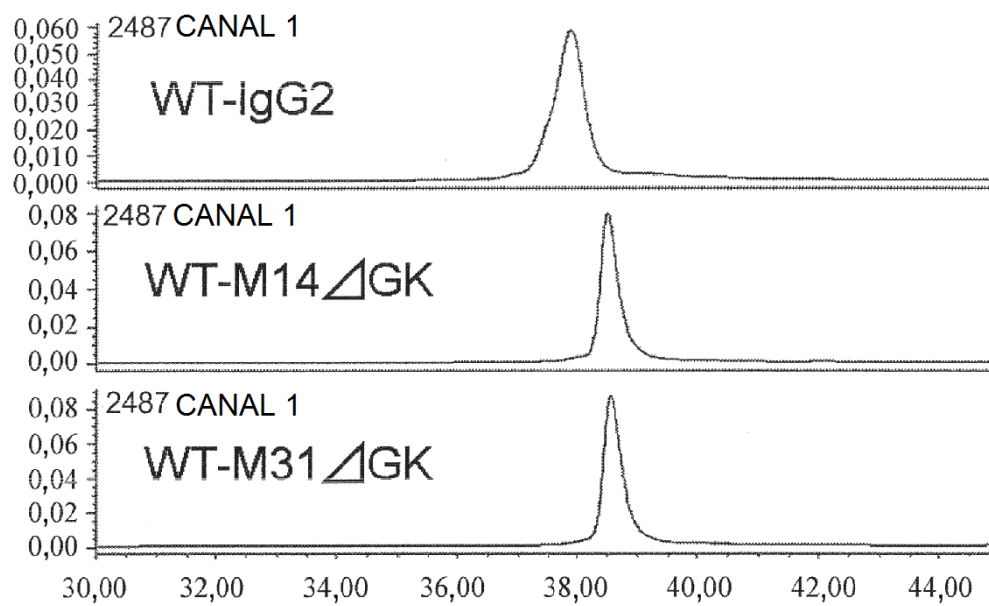


FIG. 33

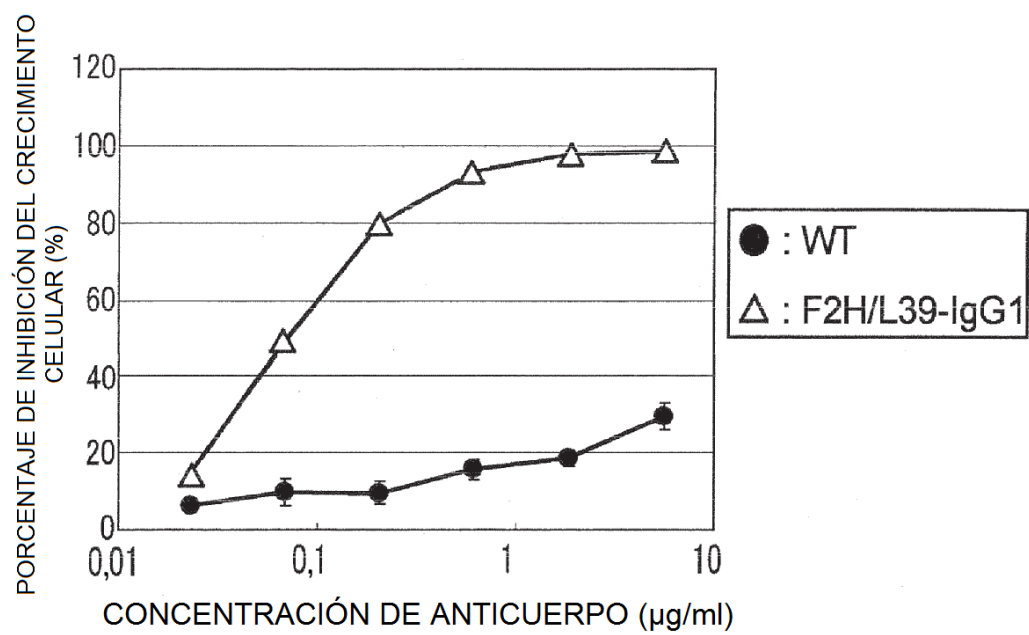


FIG. 34

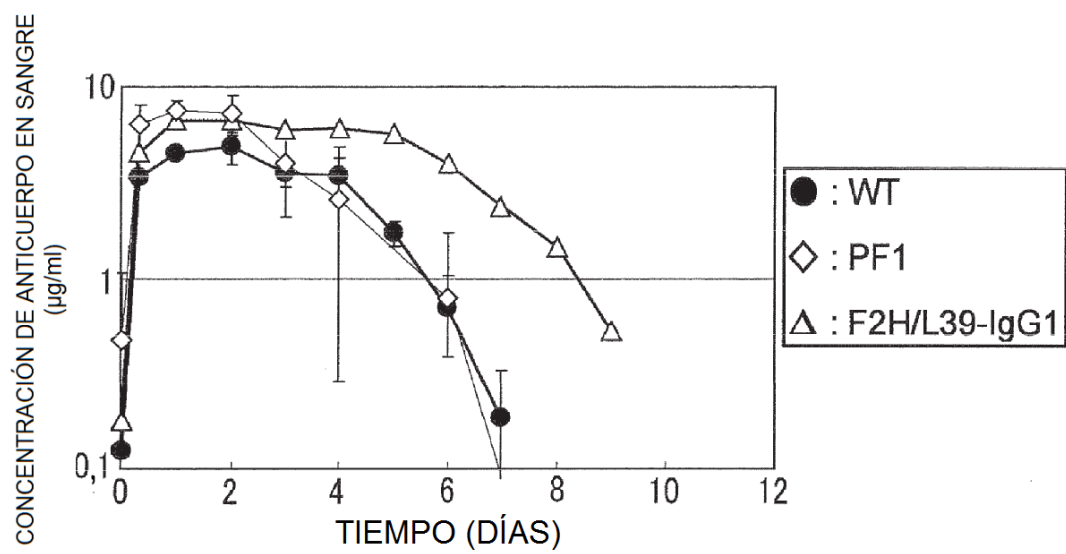


FIG. 35

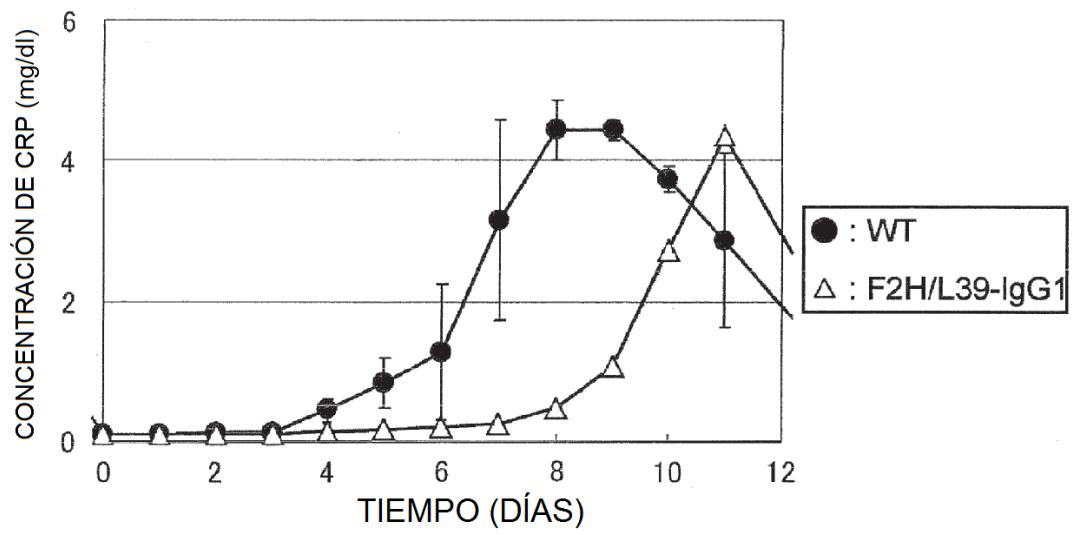


FIG. 36

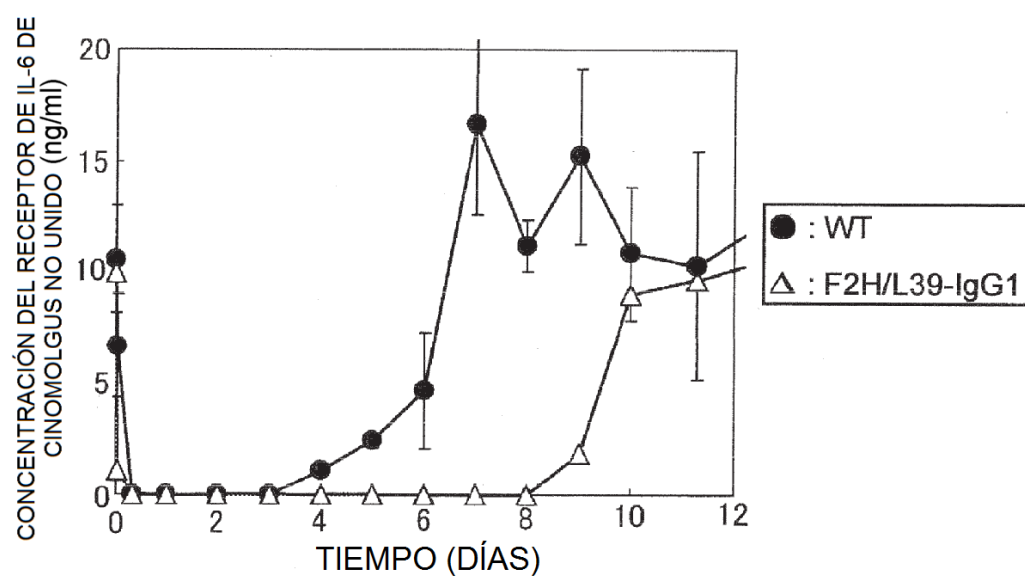


FIG. 37

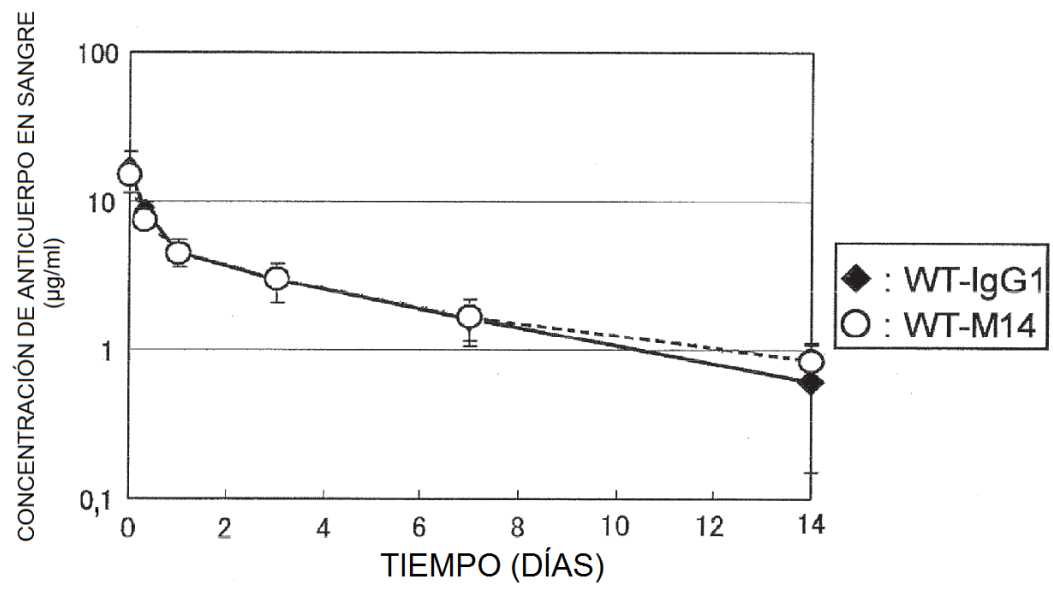


FIG. 38

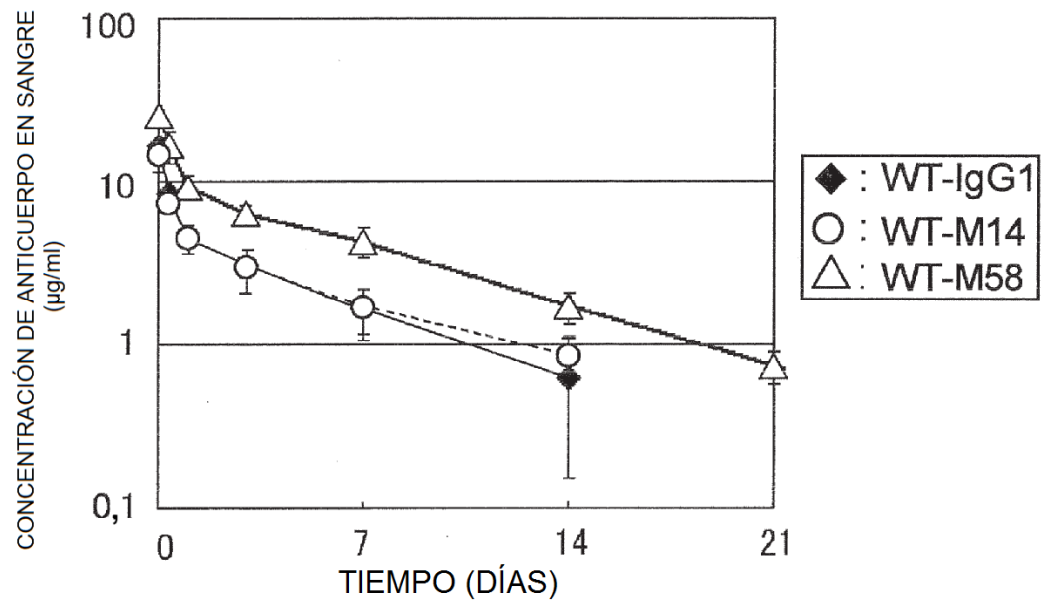


FIG. 39

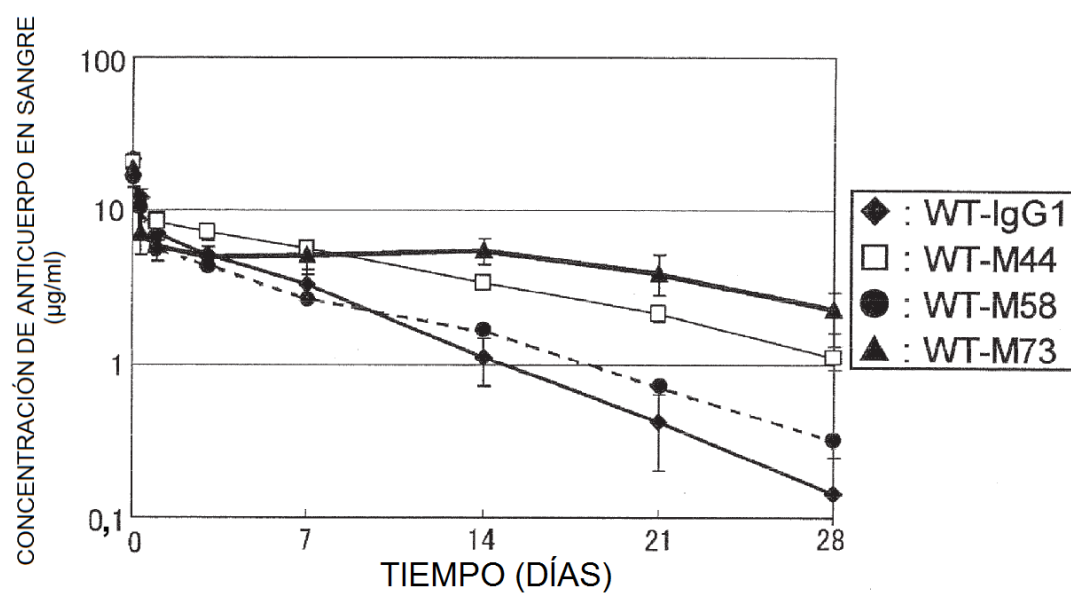


FIG. 40

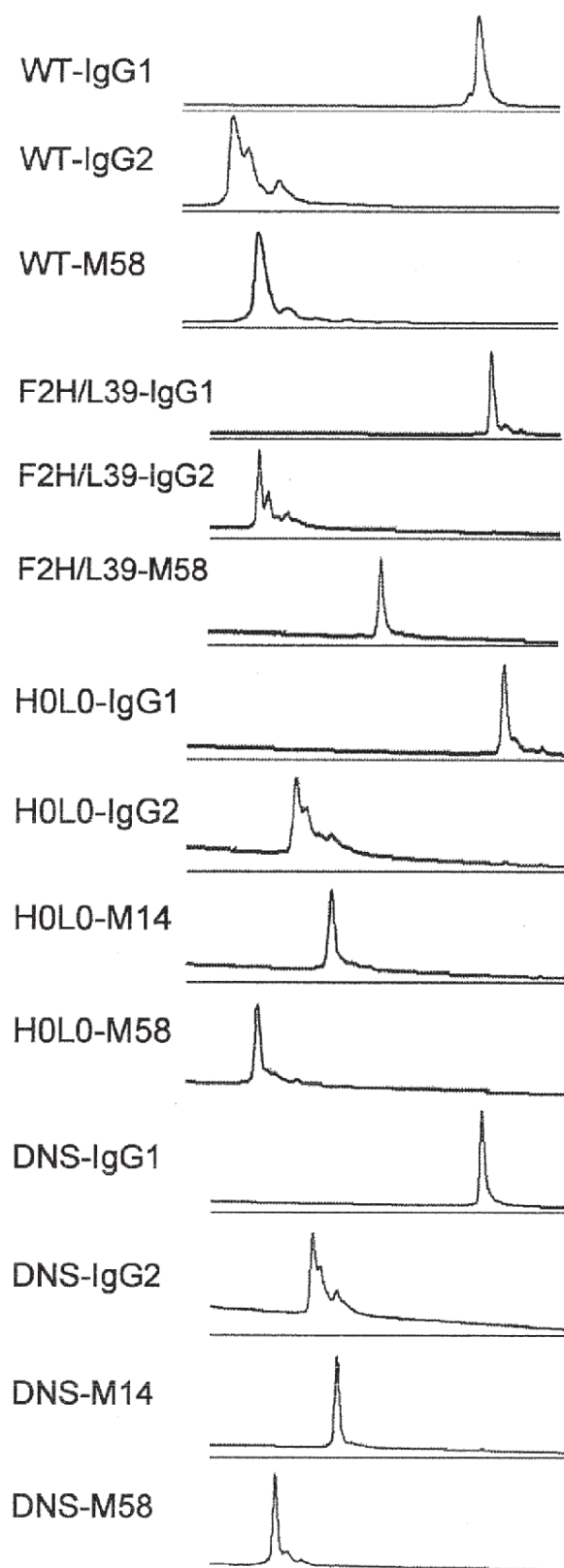


FIG. 41

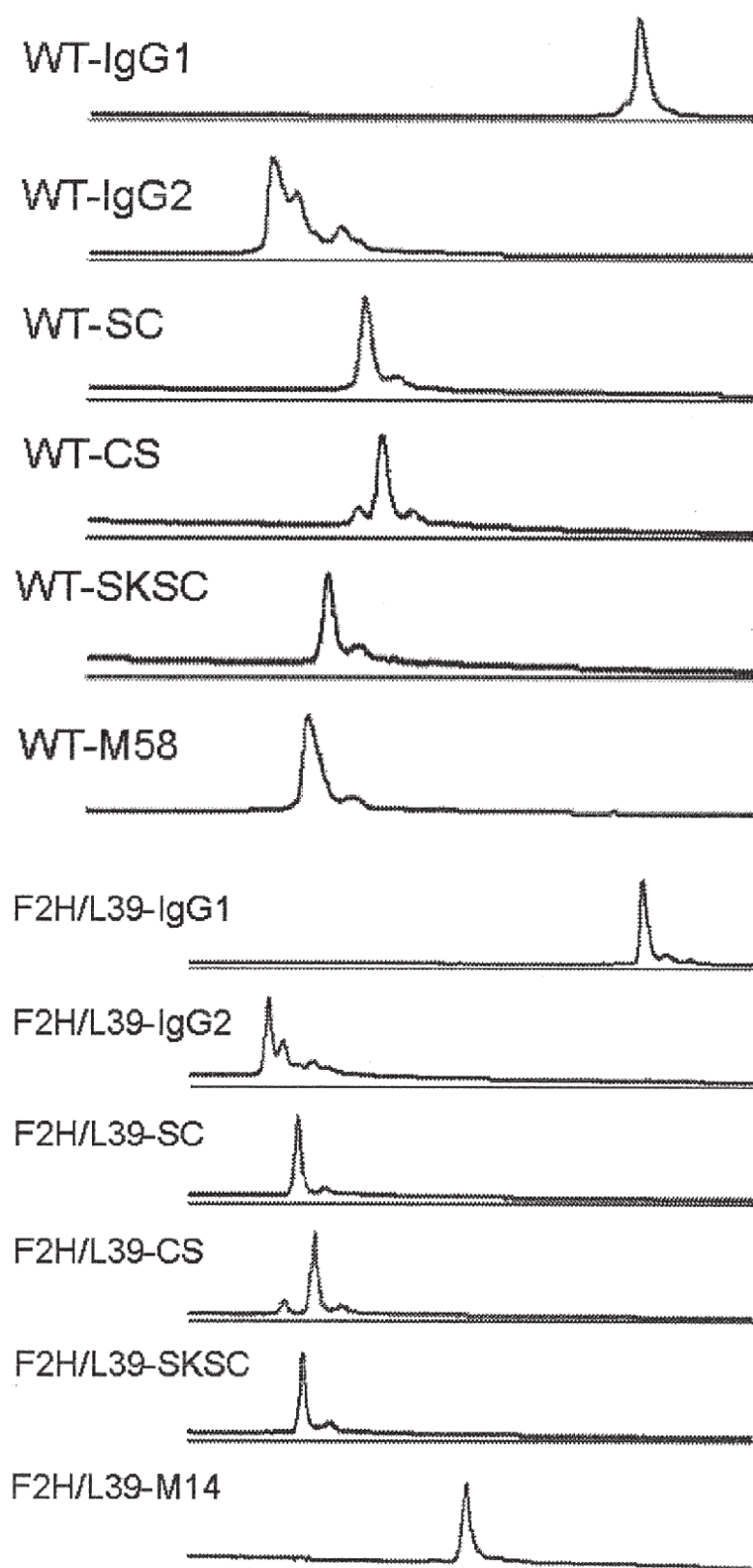


FIG. 42

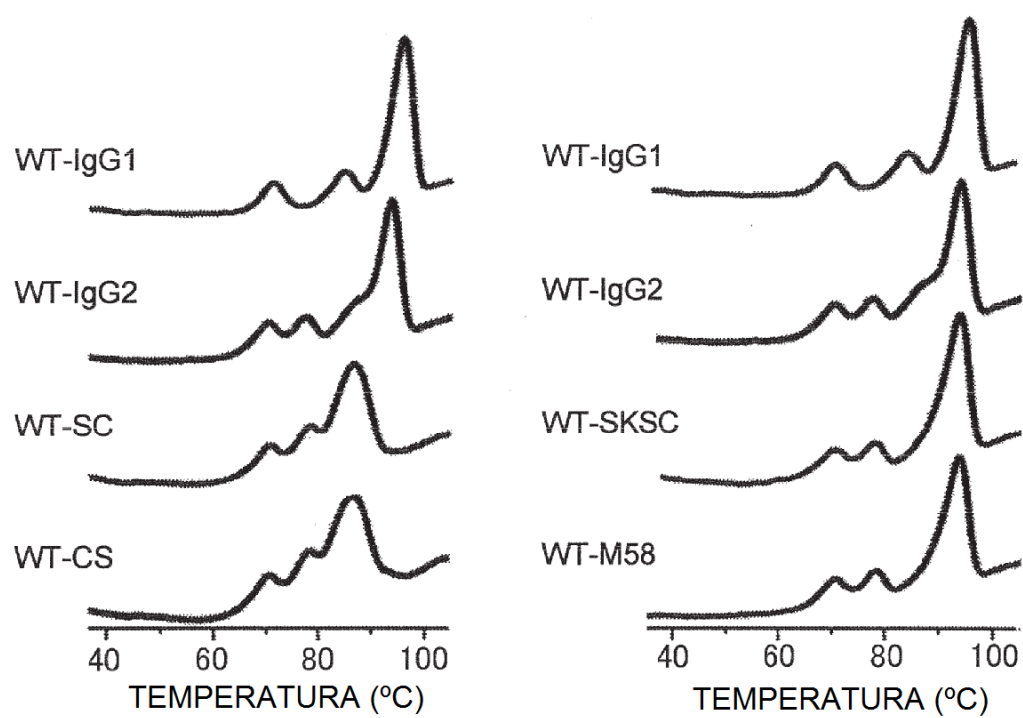


FIG. 43

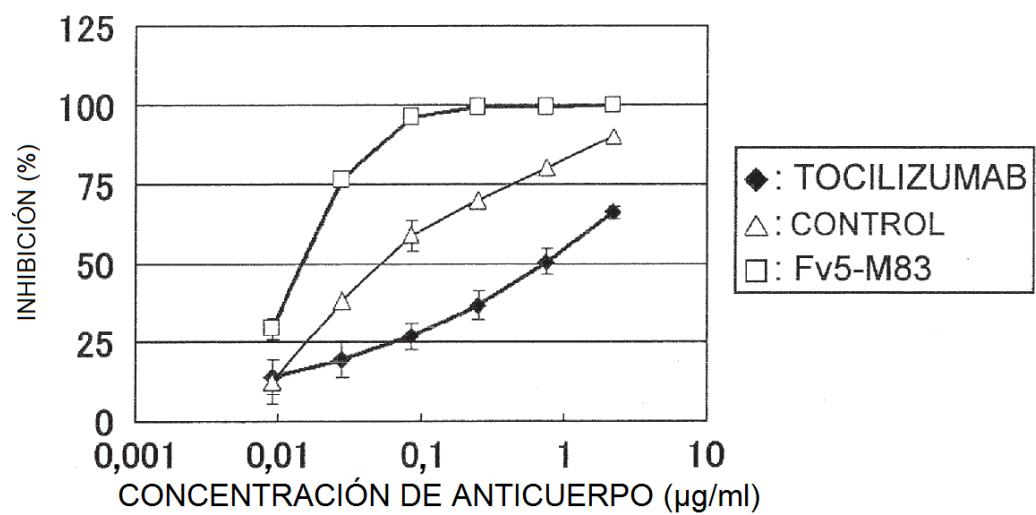


FIG. 44

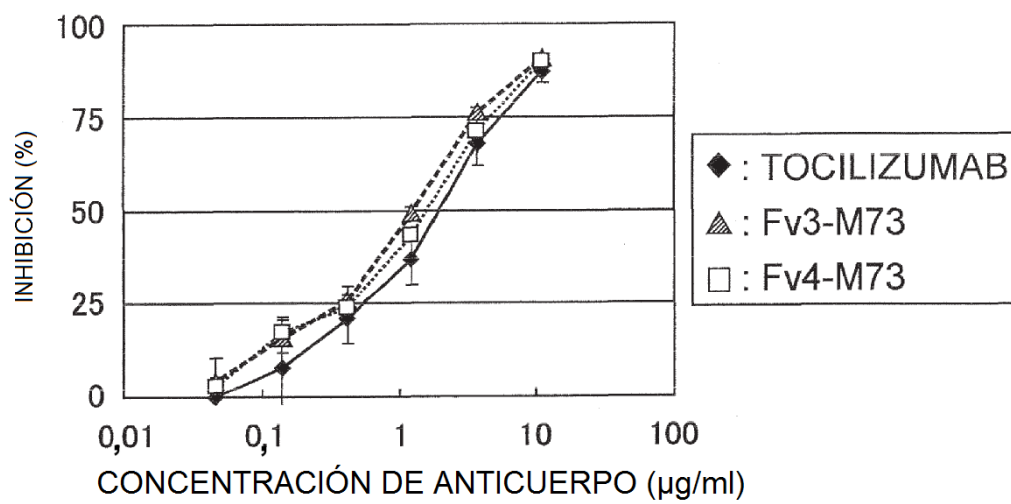


FIG. 45

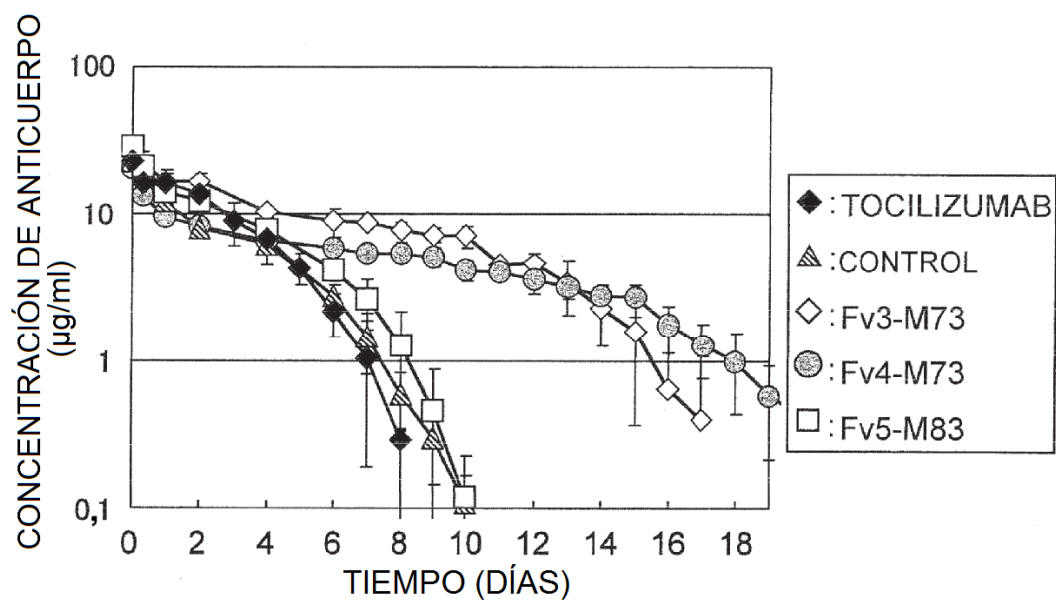


FIG. 46

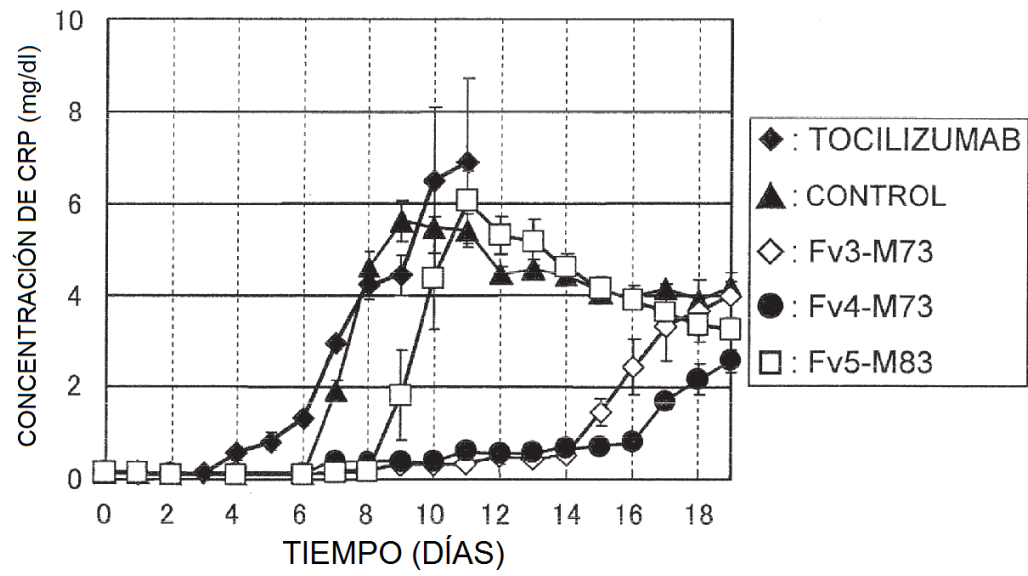


FIG. 47

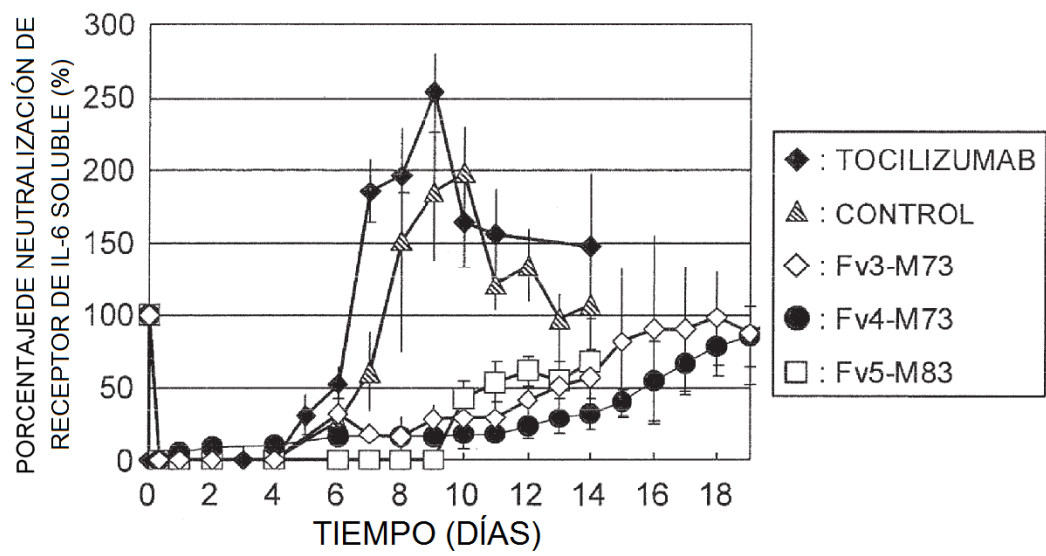


FIG. 48

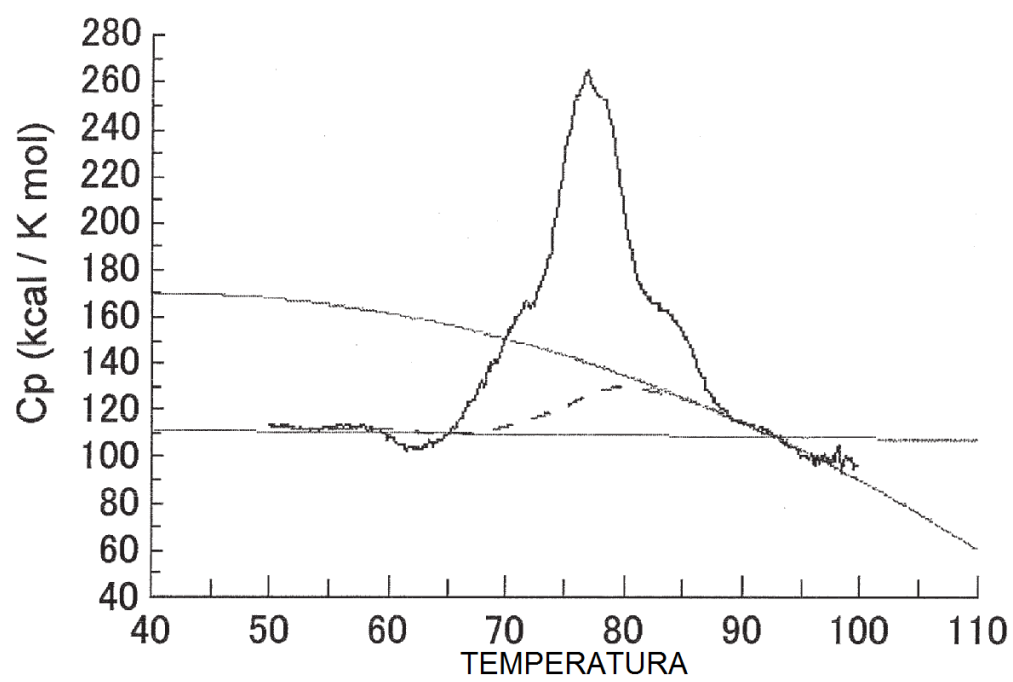


FIG. 49

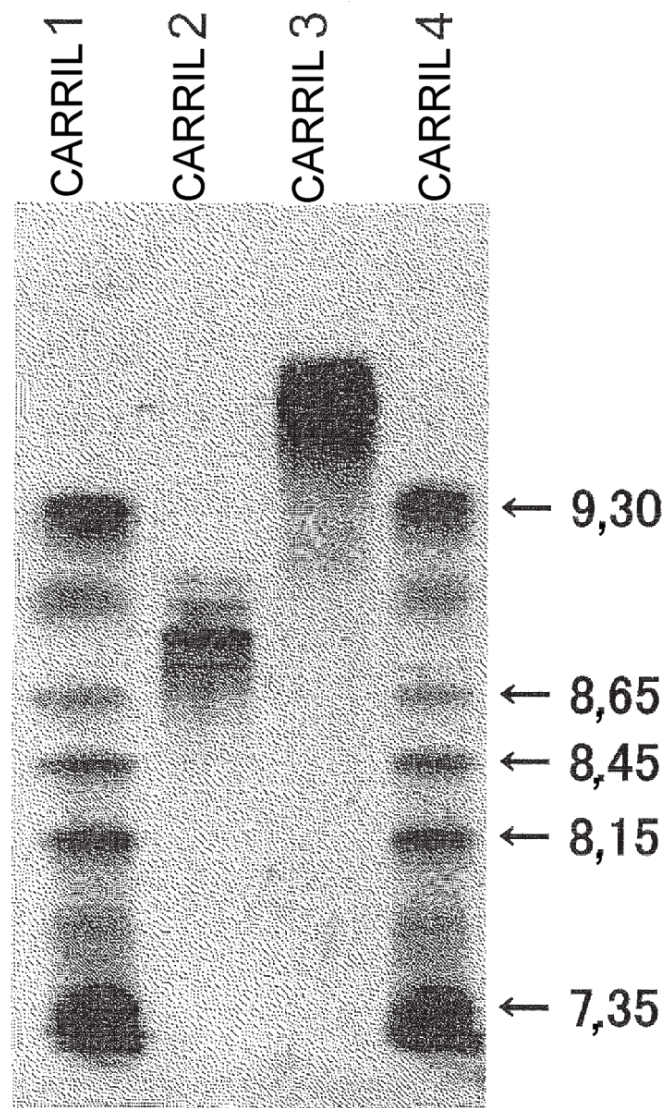


FIG. 50

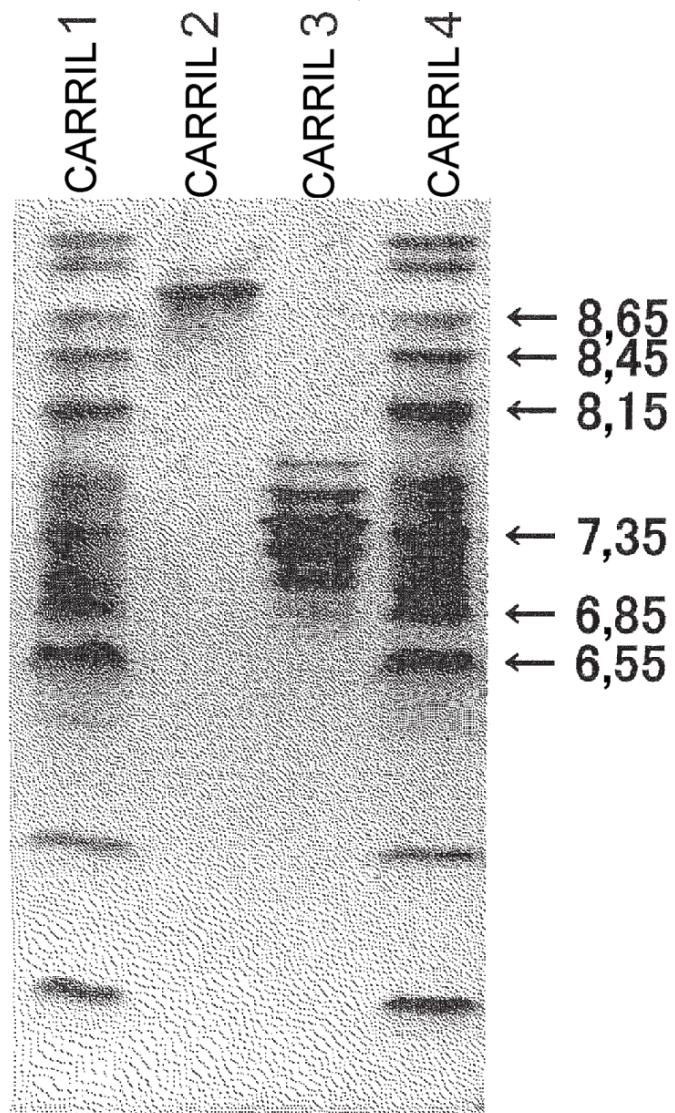


FIG. 51

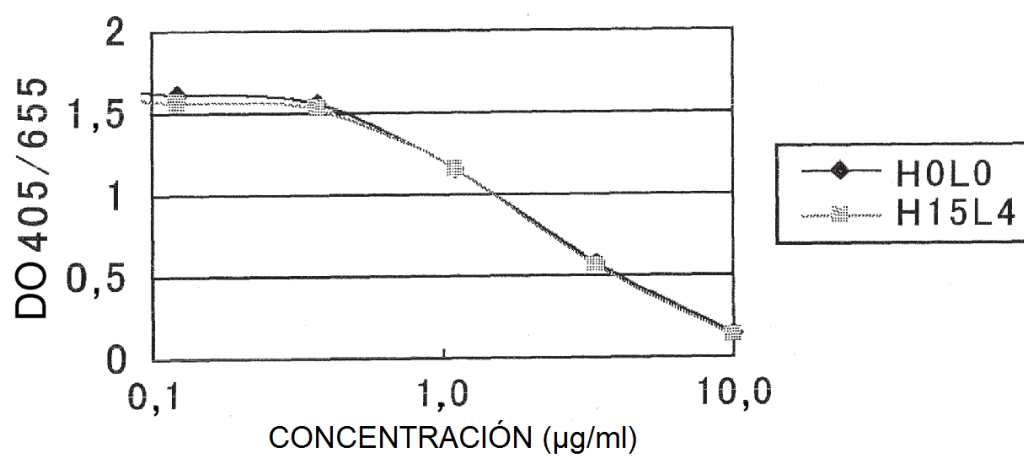


FIG. 52

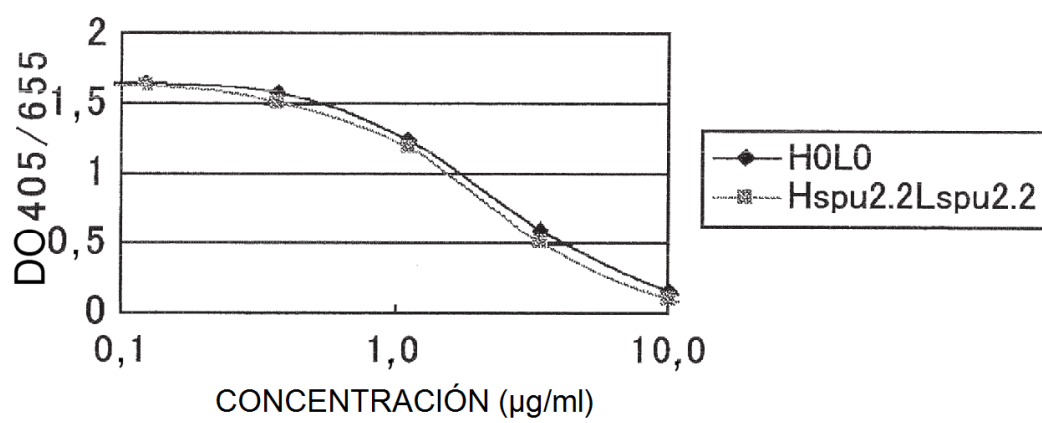


FIG. 53

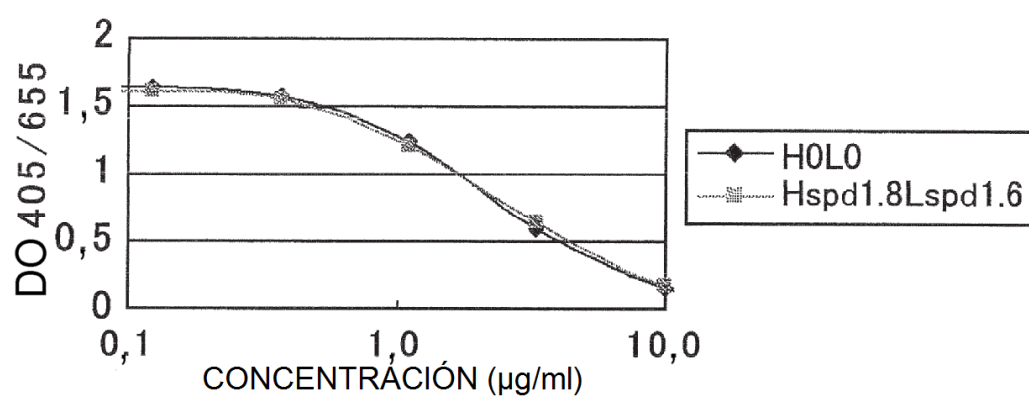
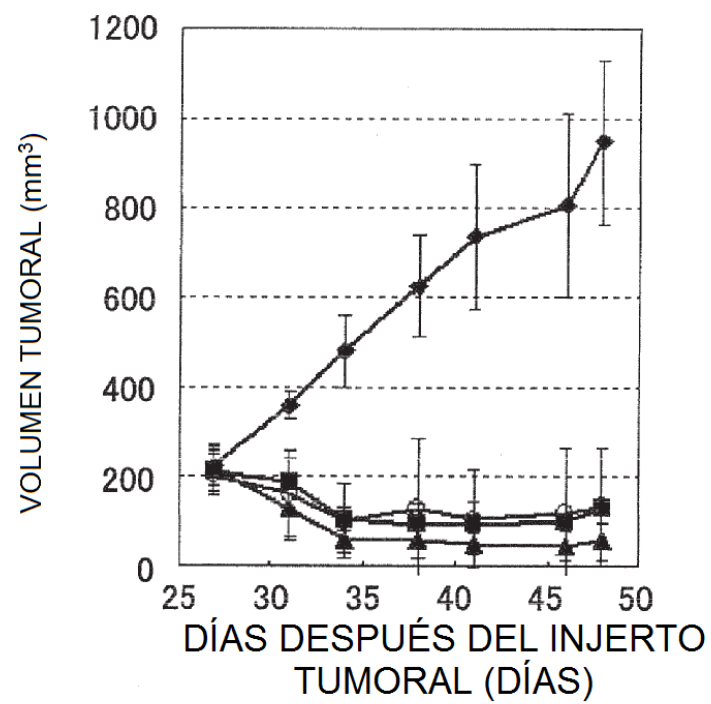


FIG. 54

A



B

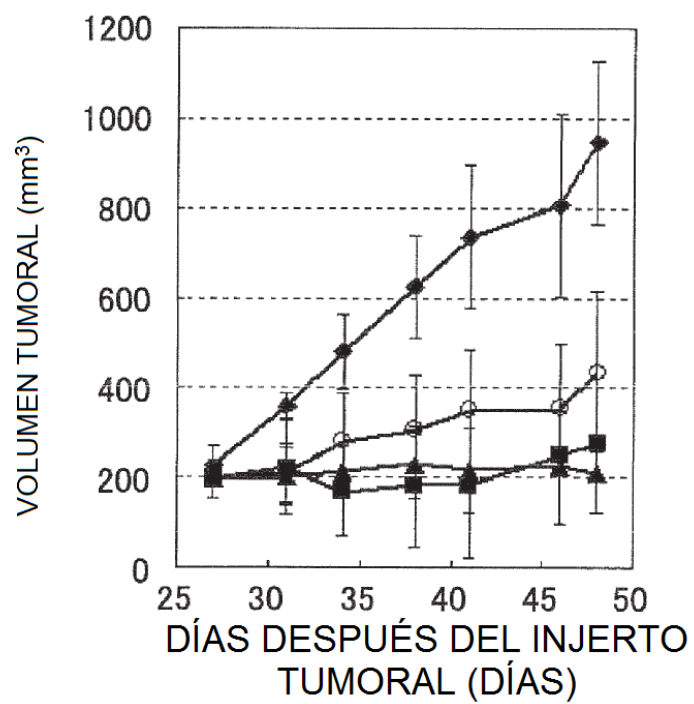


FIG. 55

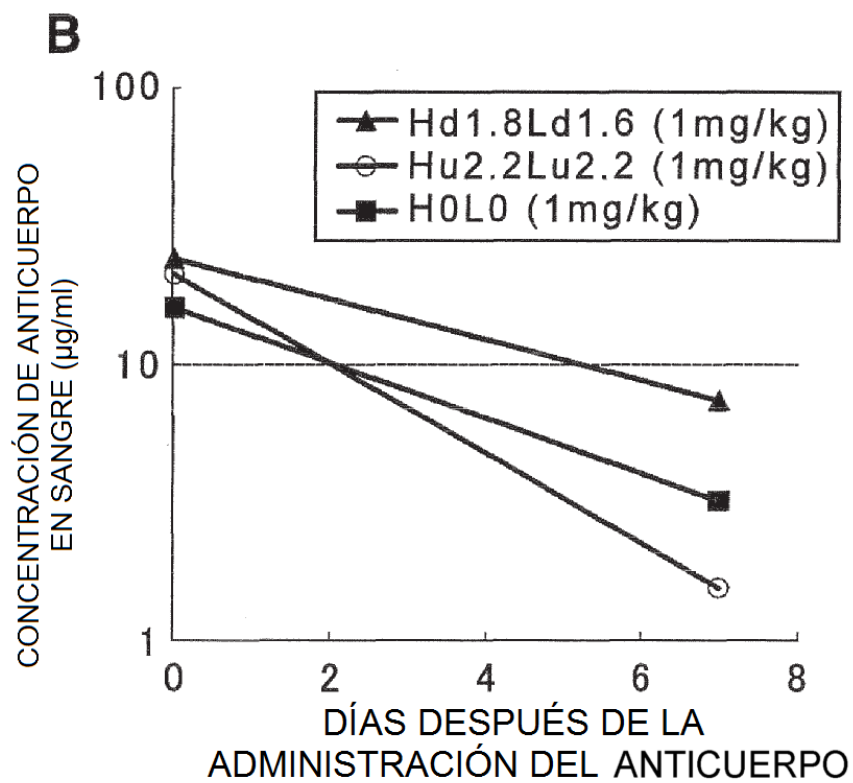
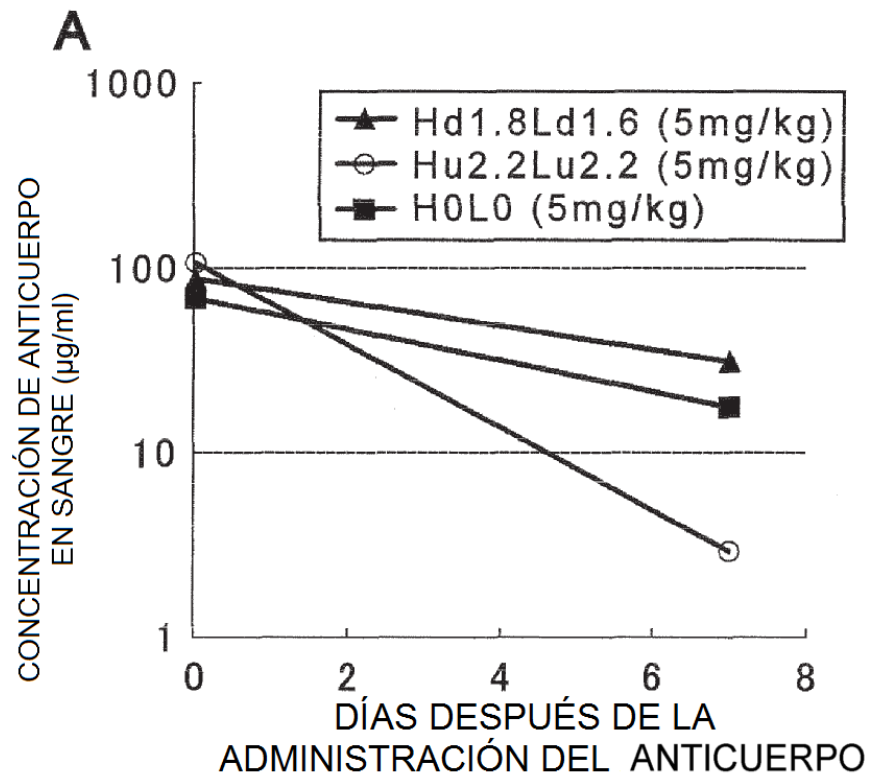


FIG. 56

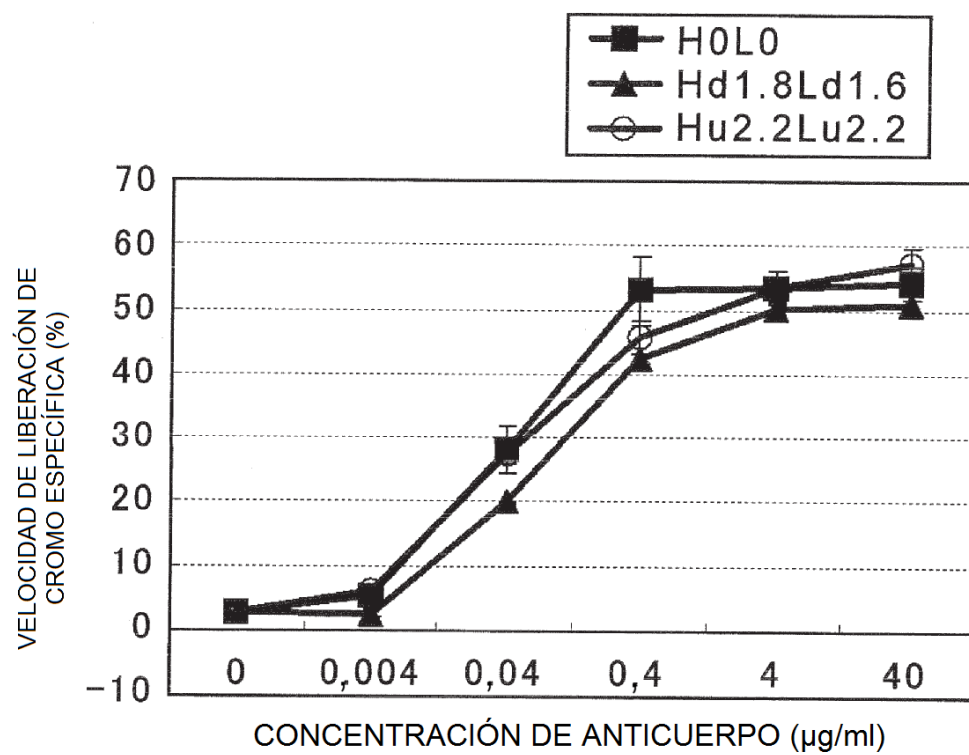


FIG. 57

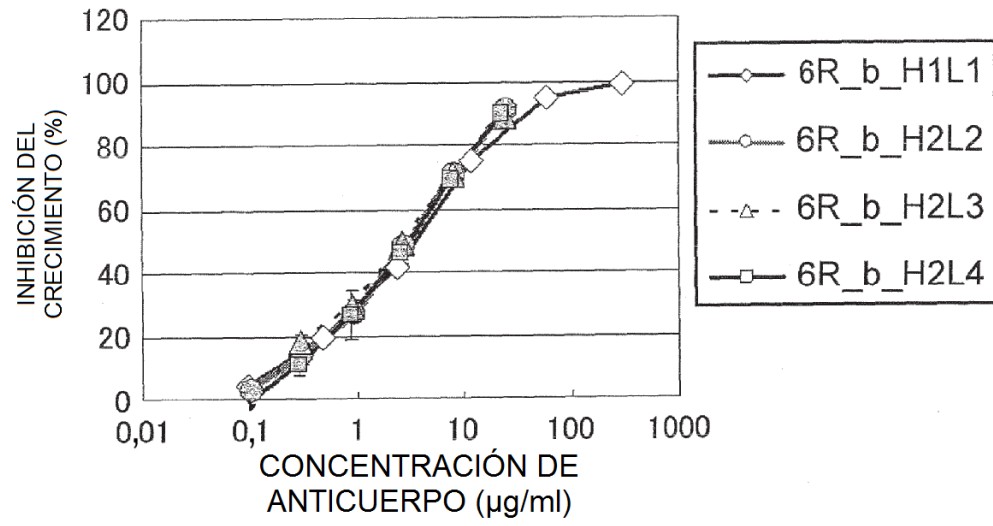


FIG. 58

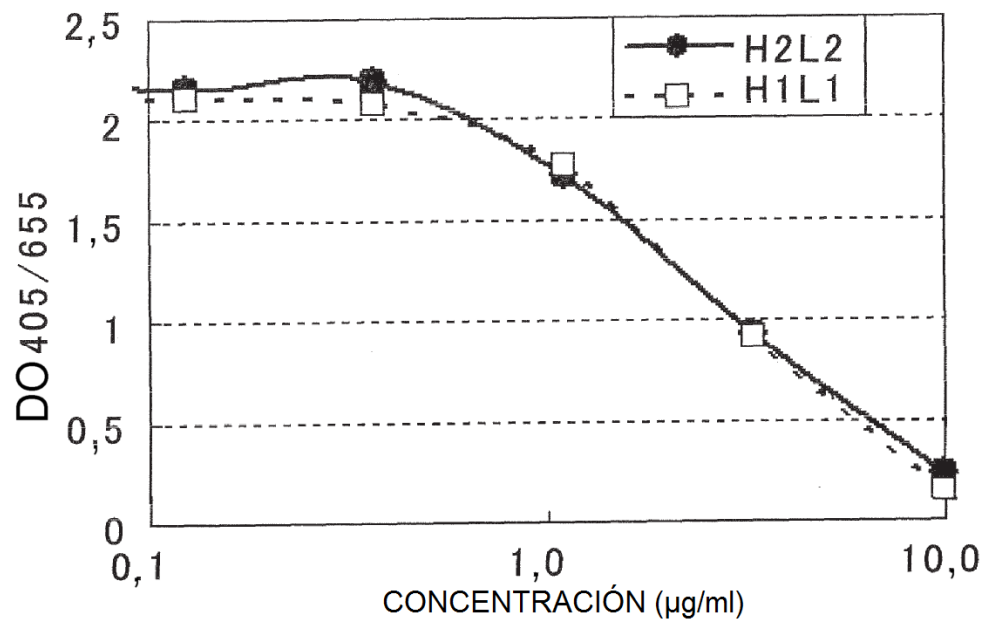


FIG. 59

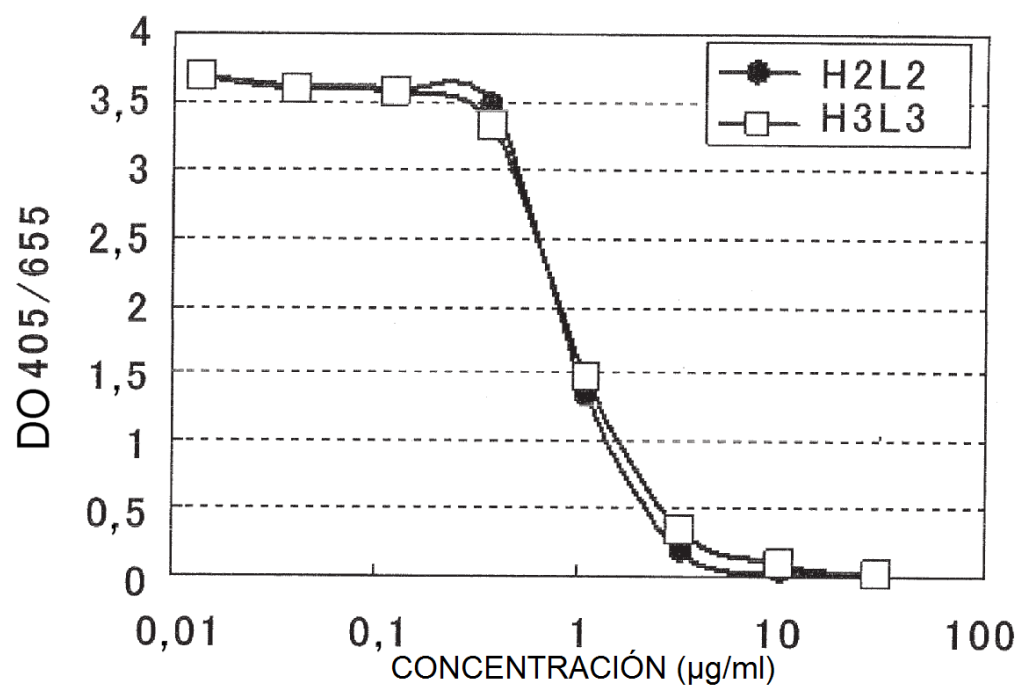


FIG. 60

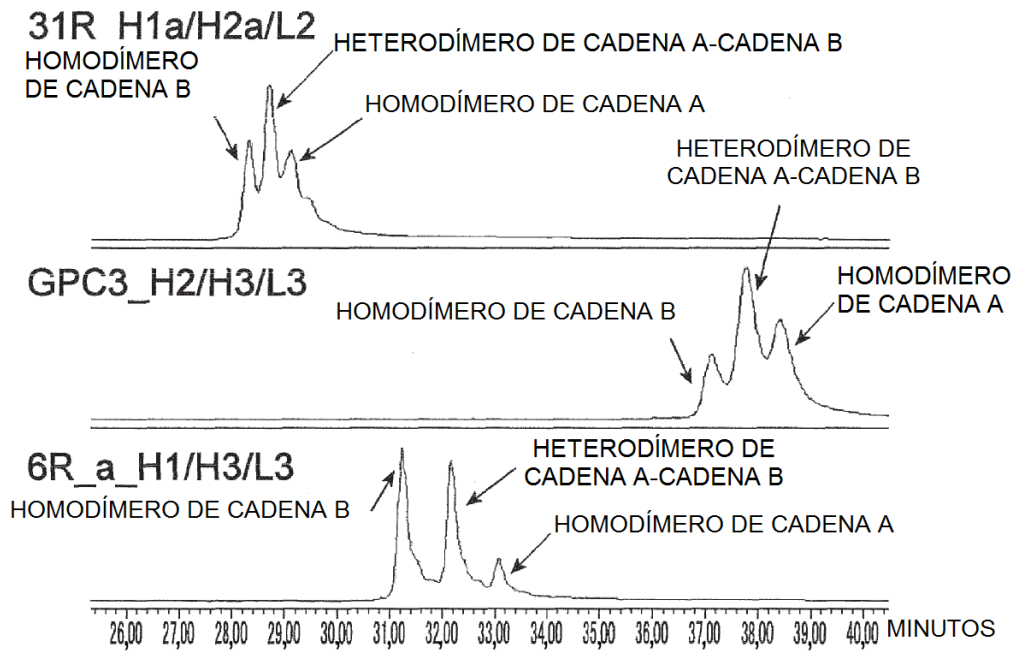


FIG. 61