

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 607**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2008 PCT/US2008/064432**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2008 WO08144763**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2008 E 08756095 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2164514**

54 Título: **Anticuerpos contra IL-6 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

21.05.2007 US 924550 P

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

28.04.2017

73 Titular/es:

**ALDERBIO HOLDINGS LLC (100.0%)
101 Convention Center Drive, Suite 850
Las Vegas, NV 89109 , US**

72 Inventor/es:

**GARCIA-MARTINEZ, LEON;
JENSEN, ANNE, ELISABETH CARVALHO;
OLSON, KATIE;
DUTZAR, BEN;
OJALA, ETHAN;
LATHAM, JOHN;
KOVACEVICH, BRIAN y
SMITH, JEFFREY, T.L.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 610 607 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

Anticuerpos contra IL-6 y usos de los mismos

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a anticuerpos y fragmentos de los mismos que tienen una especificidad de unión por IL-6. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas o diagnósticas, y anticuerpos y fragmentos de los mismos que tienen especificidad de unión por IL-6 para su uso en métodos para tratar enfermedades o trastornos asociados con IL-6 administrando dichos anticuerpos o fragmentos de los mismos.

15 Descripción de la técnica relacionada

15 La interleucina-6 (de aquí en adelante "IL-6") (también conocida como interferón- β_2 ; factor de diferenciación de células B; factor-2 estimulante de células B; factor estimulante de hepatocitos; factor de crecimiento de hibridoma; y factor de crecimiento de plasmacitoma) es una citocina funcional implicada en numerosos procesos biológicos, tales como la regulación de la respuesta inflamatoria aguda, la modulación de respuestas inmunitarias específicas que incluyen la diferenciación de células T y B, metabolismo óseo, trombopoyesis, proliferación epidérmica, menstruación, diferenciación celular neuronal, neuroprotección, envejecimiento, cáncer, y la reacción inflamatoria que se produce en la enfermedad de Alzheimer. Véase A. Papassotiropoulos, et al, *Neurobiology of Aging*, 22:863-871 (2001).

25 La IL-6 es un miembro de una familia de citocinas que promueven las respuestas celulares por medio de un complejo receptor que consiste en al menos una subunidad de la glucoproteína de transducción de señal gp130 y el receptor IL-6 ("IL-6R") (también conocido como gp80). El IL-6R también puede estar presente en una forma soluble ("sIL-6R"). La IL-6 se une al IL-6R, que entonces dimeriza el receptor gp130 de transducción de señal. Véase Jones, SA, *J. Immunology*, 175:3463-3468 (2005).

30 En los seres humanos, el gen que codifica la IL-6 se organiza en cinco exones y cuatro intrones, y se encuentra en el brazo corto del cromosoma 7 en 7p21. La traducción del ARN IL-6 y el procesamiento post-traducciona da como resultado la formación de una proteína de 21-28 kDa con 184 aminoácidos en su forma madura. Véase A. Papassotiropoulos, et al, *Neurobiology of Aging*, 22:863-871 (2001).

35 Como se expone posteriormente con mayor detalle, se cree que la IL-6 tiene un papel en el desarrollo de multitud de enfermedades y trastornos, que incluyen pero no se limitan a fatiga, caquexia, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades del sistema esquelético, cáncer, enfermedad cardíaca, obesidad, diabetes, asma, enfermedad de Alzheimer y esclerosis múltiple. Debido a la implicación percibida de la IL-6 en un amplio intervalo de enfermedades y trastornos, sigue existiendo la necesidad en la técnica de composiciones y métodos útiles para prevenir o tratar enfermedades asociadas con IL-6, así como métodos de exploración para identificar pacientes que tienen enfermedades o trastornos asociados con IL-6. Las composiciones anti-IL-6 particularmente preferidas son las que tienen reacciones adversas mínimas o minimizadas cuando se administran al paciente. Las composiciones o métodos que reducen o inhiben las enfermedades o trastornos asociados con IL-6 son beneficiosas para el paciente que los necesiten.

50 El documento WO2006/119115 describe múltiples anticuerpos monoclonales anti-IL-6 humana, tanto formas humanas modificadas como quiméricas, derivadas de AME-A9. Los anticuerpos inhiben la unión de IL-6 a IL-6R. El anticuerpo puede ser un scFv, puede estar liofilizado, y se puede utilizar para el diagnóstico o tratamiento, por ejemplo de artritis reumatoide.

Breve resumen de la invención

55 La materia objeto de la invención se define en las reivindicaciones. La presente invención proporciona un anticuerpo anti-IL-6 o fragmento de anticuerpo del mismo que comprende (i) una cadena ligera variable (V_L) que comprende un polipéptido CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, un polipéptido CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y un polipéptido CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y (ii) una cadena variable pesada (V_H) que comprende un polipéptido CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, un polipéptido CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 120, y un polipéptido CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, donde el anticuerpo o fragmento del mismo tiene una constante de disociación (KD) de menos de 50 picomolar como se evalúa por Biacore.

65 La presente invención se refiere a anticuerpos específicos y fragmentos de los mismos que tienen especificidad de unión por IL-6, en particular, anticuerpos que tienen una especificidad epitópica específica y/o propiedades funcionales. Una realización de la invención engloba anticuerpos humanizados específicos y fragmentos de los

mismos capaces de unirse a IL-6 y/o el complejo IL-6/IL-6R. Estos anticuerpos se pueden unir a la IL-6 soluble o IL-6 que se expresa en la superficie celular. También, estos anticuerpos pueden inhibir la formación o los efectos biológicos de uno o más de IL-6, complejos IL-6/IL-6R, complejos IL-6/IL-6R/gp130 y/o multímeros de IL-6/IL-6R/gp130.

5 Otra realización de la presente invención se relaciona con los anticuerpos descritos en el presente documento, que comprenden las secuencias de la V_H , V_L y polipéptidos CDR de acuerdo con las presentes reivindicaciones, y los polinucleótidos que las codifican. En más realizaciones específicas de la invención estos anticuerpos bloquearán la activación de gp130 y/o poseen afinidades de unión (K_d) menores de 50 picomolar y/o valores de k_{off} menores o iguales a $10^{-4} S^{-1}$.

10 En otra realización de la invención estos anticuerpos y las versiones humanizadas, se derivarán de células inmunitarias de conejo (linfocitos B) y se pueden seleccionar basándose en su homología (identidad de secuencia) con las secuencias de la línea germinal humana. Estos anticuerpos pueden necesitar o no modificaciones de secuencia mínimas, facilitando de esta manera que se mantengan las propiedades funcionales tras la humanización.

15 En otra realización de la invención los anticuerpos en cuestión se pueden seleccionar basándose en su actividad en ensayos funcionales tales como los ensayos de proliferación de T1165 dirigida por IL-6, ensayos de producción de haptoglobina HepG2 estimulada por IL-6, y similares. Una realización adicional de la invención se refiere a fragmentos de anticuerpos anti-IL-6 que engloban polipéptidos V_H , V_L y CDR de acuerdo con las presentes reivindicaciones, por ejemplo, derivados de células inmunitarias de conejo y los polinucleótidos que codifican los mismos, así como el uso de estos fragmentos de anticuerpo y los polinucleótidos que los codifican en la creación de nuevas composiciones de anticuerpos y polipéptidos capaces de reconocer la IL-6 y/o complejos IL-6/IL-6R o complejos IL-6/IL-6R/gp130 y/o multímeros de los mismos.

20 La invención también contempla conjugados de anticuerpos anti IL-6 y fragmentos de unión de los mismos conjugados con uno o más restos funcionales o detectables. También se describen métodos para producir dichos anticuerpos anti-IL-6 humanizados o anti-complejos IL-6/IL-6R y fragmentos de unión de los mismos. En una realización, los fragmentos de unión incluyen pero no se limitan a fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv y scFv.

25 Las realizaciones de la invención se refieren a anticuerpos anti-IL-6 de acuerdo con las presentes reivindicaciones para su uso como un agente terapéutico o diagnóstico en el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con la IL-6 o la expresión aberrante de la misma. La invención también contempla el uso de fragmentos de anticuerpos anti-IL-6 de acuerdo con las presentes reivindicaciones en la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con la IL-6 o la expresión aberrante de la misma. Los anticuerpos en cuestión se pueden utilizar en el tratamiento de la fatiga y/o caquexia asociadas al cáncer y artritis reumatoide.

30 También se describe en el presente documento la producción de anticuerpos anti-IL-6 en células huésped recombinantes, preferentemente levaduras diploides tales como *Pichia* diploides y otras cepas de levadura.

Breve descripción de varias vistas de los dibujos

35 La Fig. 1 muestra que se reconocían una variedad de epítopos únicos por la colección de anticuerpos anti-IL-6 preparados por el protocolo de selección de anticuerpos. La variabilidad de epítopo se confirmó por estudios de competición de unión de anticuerpos a IL-6 (Forte-Bio Octeto).

40 La Fig. 2 muestra alineamientos de secuencias variables ligeras y variables pesadas entre secuencias variables ligeras y variables pesadas de un anticuerpo de conejo y secuencias humanas homólogas y las secuencias humanizadas finales. Las regiones marco conservadas se identifican como FR1-FR4. Las regiones determinantes de complementariedad se identifican como CDR1-CDR3. Los restos de aminoácidos se numeran como se muestra. Las secuencias de conejo iniciales se llaman RbtVL y RbtVH para las secuencias variable ligeras y variables pesadas, respectivamente. Tres de las secuencias de anticuerpo de la línea germinal humana, que abarcan desde la región marco conservada 1 hasta el final de la región marco conservada 3, se alinean por debajo de las secuencias de conejo. La secuencia humana que se considera más similar a la secuencia de conejo se muestra primero. En este ejemplo, las secuencias más similares son L12A para la cadena ligera y 3-64-04 para la cadena pesada. Las secuencias de CDR3 humanas no se muestran. La secuencia de la región marco conservada 4 humana más cercana se alinea por debajo de la región marco conservada 4 del conejo. Las líneas discontinuas verticales indican un resto en el que el resto de conejo es idéntico con uno o más de los restos humanos en la misma posición. Los restos en negrita indican que el resto humano en esa posición es idéntico al resto de conejo en la misma posición. Las secuencias humanizadas finales se llaman VLh y VHh para las secuencias variables ligeras y variables pesadas, respectivamente. Los restos subrayados indican que el resto es el mismo que el resto de conejo en esa posición pero diferente que los restos humanos en esa posición en las tres secuencias humanas alineadas.

45 La Fig. 3 demuestra la alta correlación entre la IgG producida y la especificidad antigénica por un protocolo de IL-6 ejemplar. 9 de los 11 pocillos presentaban una correlación específica de IgG con reconocimiento del antígeno.

50 La Fig. 4 proporciona la curva de respuesta a la dosis de la α -2-macroglobulina (A2M) para el anticuerpo Ab1 que

se administra por vía intravenosa a diferentes dosis una hora después de una dosis de 100 µg/kg s.c. de IL-6 humana.

La Fig. 5 proporciona los datos de supervivencia para los grupos de progresión con el anticuerpo Ab1 frente a los grupos de control.

5 La Fig. 6 proporciona datos de supervivencia adicionales para los grupos de regresión con el anticuerpo Ab1 frente a los grupos de control.

La Fig. 7 proporciona datos de supervivencia para la IgG policlonal humana a 10 mg/kg i.v. cada tres días (tamaño tumoral 270-320 mg) frente al Ab1 a 10 mg/kg i.v. cada tres días (tamaño del tumor 270-320 mg).

10 La Fig. 8 proporciona los datos de supervivencia para la IgG policlonal humana a 10 mg/kg i.v. cada tres días (tamaño tumoral 400-527 mg) frente al anticuerpo Ab1 a 10 mg/kg i.v. cada tres días (tamaño tumoral 400-527 mg).

La Fig. 9 proporciona un perfil farmacocinético del anticuerpo Ab1. Los niveles plasmáticos del anticuerpo Ab1 se cuantificaron por medio de un ELISA de captura de antígeno. Esta proteína presenta una semivida de entre 12 y 17 días que es coherente con otros anticuerpos humanizados de longitud completa.

15 La Fig. 10A-D proporcionan los datos de unión para los anticuerpos Ab4, Ab3, Ab8 y Ab2, respectivamente. La Fig. 10E proporciona los datos de unión para los anticuerpos Ab1, Ab6 y Ab7.

La Fig. 11 resume los datos de unión de las Figuras 10A-E en forma tabular.

La Fig. 12 presenta las secuencias de los péptidos de 15 aminoácidos que se utilizan en el experimento de mapeo de péptidos del Ejemplo 14.

20 La Fig. 13 presenta los resultados de las transferencias preparadas en el Ejemplo 14.

La Fig. 14 presenta los resultados de las transferencias preparadas en el Ejemplo 14.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

25 **Definiciones**

Se tiene que entender que la presente invención no se limita a la metodología particular, protocolos, líneas celulares, especies o géneros de animales, y reactivos descritos, ya que pueden variar. También se tiene que entender que la terminología que se utiliza en el presente documento es solo con el fin de describir realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que solo se limitará por las reivindicaciones adjuntas.

30 Como se utiliza en el presente documento, las formas singulares “un”, “una” y “el” incluyen los referentes en plural a menos de que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a “una célula” incluye una pluralidad de dichas células y la referencia a “la proteína” incluye la referencia a una o más proteínas y equivalentes de la misma que conocen los expertos en la técnica, y demás. Todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que entiendo comúnmente un experto habituado en la técnica a la cual pertenece la presente invención a menos de que se indique claramente otra cosa.

40 Interleucina-6 (IL-6): como se utiliza en el presente documento, interleucina-6 (IL-6) engloba no solamente la secuencia de 212 aminoácidos siguiente disponible como N° de acceso de GenBank NP_00591:

MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQI
RYILDGISALRKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGCQSGFNEETCLV
KIITGLLEFEVYLEYLQNRFSSEEQARAVQMSTKVLQFLQKKAKNLDAITTPDPT

45 TNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM (SEQ ID NO: 1), sino también cualquier pre-pro, pro- y formas maduras de esta secuencia de aminoácidos de IL-6, así como los mutantes y las variantes que incluyen las variantes alélicas de esta secuencia.

50 *Especie de levadura competente emparejada*: Esto pretende englobar ampliamente cualquier levadura diploide o tetraploide que pueda cultivarse en un cultivo. Dicha especie de levadura puede existir en forma haploide, diploide o tetraploide. Las células de una determinada ploidía pueden, en condiciones apropiadas, proliferar un número indefinido de generaciones de esta forma. Las células diploides también pueden esporular para formar células haploides. El emparejamiento secuencial puede dar como resultado cepas tetraploides por medio de emparejamientos adicionales o fusiones de células diploides. Las células de levadura diploides o poliploides se producen preferentemente por emparejamiento o fusión de esferoplastos.

60 La levadura competente emparejada puede ser un miembro de la familia *Saccharomycetaceae*, que incluye los géneros *Arxiozyma*; *Ascobotryozyma*; *Citeromyces*; *Debaryomyces*; *Dekkera*; *Eremothecium*; *Issatchenkia*; *Kazachstania*; *Kluyveromyces*; *Kodamaea*; *Lodderomyces*; *Pachysolen*; *Pichia*; *Saccharomyces*; *Saturnispora*; *Tetrapisispora*; *Torulaspora*; *Williopsis*; y *Zygosaccharomyces*. Otras tipos de levaduras incluyen *Yarrowia*, *Rhodospodium*, *Candida*, *Hansenula*, *Filobasium*, *Filobasidella*, *Sporidiobolus*, *Bullera*, *Leucosporidium* y *Filobasidella*.

65 La levadura competente emparejada puede ser un miembro del género *Pichia*. La levadura competente emparejada del género *Pichia* puede ser una de las siguientes especies: *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, y *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*). La levadura competente emparejada del género *Pichia* puede ser de la especie *Pichia*

pastoris.

Célula de levadura haploide: Una célula que tiene una única copia de cada gen de su complemento genómico normal (cromosómico).

5 *Célula de levadura poliploide*: Una célula que tiene más de una copia de su complemento genómico normal (cromosómico).

10 *Célula de levadura diploide*: Un célula que tiene dos copias (alelos) de esencialmente cada gen de su complemento genómico normal, normalmente se forma por el proceso de fusión (emparejamiento) de dos células haploides.

15 *Célula de levadura tetraploide*: Una célula que tiene cuatro copias (alelos) de esencialmente cada gen de su complemento genómico normal, normalmente se forma por el proceso de fusión (emparejamiento) de dos células diploides. Las tetraploides pueden albergar dos, tres, cuatro, o más casetes de expresión diferentes. Dichas tetraploides se pueden obtener en *S. cerevisiae* por emparejamiento selectivo de diploides homocigotas, heterotalias a/a y diploides alfa/alfa y en *Pichia* por emparejamiento secuencial de haploides para obtener diploides auxotróficas. Por ejemplo, una haploide [met his] puede emparejarse con una haploide [ade his] para obtener una diploide [his]; y se puede emparejar una haploide [met arg] con una haploide [ade arg] para obtener una diploide [arg]; luego la diploide [his] x la diploide [arg] se obtiene un prototrofo tetraploide. Se entenderá por el experto en la técnica que esta referencia a los beneficios y usos de células diploides se puede aplicar también a las células tetraploides.

Emparejamiento de levaduras: Es el proceso por el que dos levaduras haploides se fusionan naturalmente para formar una célula de levadura diploide.

25 *Meiosis*: Es el proceso por el cual una célula diploide se somete a una división reductiva para formar cuatro productos haploides esporulados. Cada espora puede germinar entonces y formar una línea celular que crece vegetativamente.

30 *Marcador genético*: Un marcador genético es un gen o fragmento de un gen que confiere un fenotipo de crecimiento (características físicas de crecimiento) en una célula que recibe ese gen, como por ejemplo, por medio de un evento de transformación. El marcador genético permite a las células sobrevivir y crecer en un medio de cultivo selectivo en condiciones en las que las células que no reciben un gen marcador genético no pueden crecer. En general, los marcadores genéticos se encuentran en varios tipos, que incluyen genes marcadores genéticos positivos tales como un gen que confiere en una célula resistencia a un antibiótico u otro fármaco, temperatura cuando dos mutantes ts se cruzan o un mutante ts se transforma; generes marcadores genéticos negativos tales como un gen biosintético que confiere a una célula la capacidad de crecer en un medio sin un nutriente específico necesario para todas las células que no tienen ese gen biosintético, o un gen biosintético mutado que confiere a la células la incapacidad de crecer si las células no tienen el gen de tipo silvestre, y similares. Los marcadores genéticos adecuados incluyen pero no se limitan a: ZEO; G418; LYS3; MET1; MET3a; ADE1; ADE3; URA3; y similares.

40 *Vector de expresión*: Estos vectores ADN contienen elementos que facilitan la modificación para que se exprese una proteína ajena en la célula huésped diana. Convenientemente, la modificación de secuencias y la producción de ADN por transformación se lleva a cabo en primer lugar en una bacteria huésped, por ejemplo, *E. coli* y habitualmente los vectores incluirán secuencias para facilitar dichas modificaciones, que incluyen un origen de replicación bacteriano y un marcador genético bacteriano. Los marcadores genéticos codifican proteínas necesarias para la supervivencia o crecimiento de las células huésped transformadas que se cultivan en un medio de cultivo selectivo. Las células huésped no transformadas con el vector que contiene el de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, (b) deficiencias de complemento auxotrófico, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de los medio complejos. Los vectores ejemplares y los métodos para la transformación de levaduras se describen, por ejemplo en Burke, D., Dawson, D., & Stearns, T. (2000). *Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

55 Los vectores de expresión para su uso en los métodos de la invención incluirán adicionalmente secuencias específicas de levadura que incluyen un indicador genético auxotrófico o de fármaco para identificar las cepas de levadura transformadas. Un marcador de fármaco se puede utilizar adicionalmente para amplificar el número de copias del vector en una célula huésped de levadura.

60 La secuencia codificante de un polipéptido de interés está unida operativamente a secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales que proporcionan la expresión del polipéptido en las células de levadura. Estos componentes del vector pueden incluir, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: un elemento amplificador, un promotor, y una secuencia determinación de la transcripción. Las secuencias para la secreción del polipéptido se pueden incluir también, por ejemplo, una señal de secuencia, y similares. Un origen de replicación de levaduras es opcional, ya que los vectores de expresión se integran a menudo en el genoma de la levadura.

65 El polipéptido de interés puede estar unido operativamente, o fusionado, a secuencias que proporcionan la secreción

optimizada del polipéptido a partir de células de levadura diploides.

Los ácidos nucleicos están “unidos operativamente” cuando se colocan en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una secuencia de señal está unido operativamente a un ADN de un polipéptido si se expresa como una pre-proteína que participa en la secreción del polipéptido, un promotor o amplificador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta la transcripción. En general, “unido operativamente” significa que las secuencia de ADN que se unen son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contigua y en fase de lectura. Sin embargo los amplificadores no tienen que ser contiguos. La unión se consigue por la unión de sitios de restricción convenientes o alternativamente por medio del método de re-combinación por PCR que es familiar para los expertos en la técnica (Tecnología Gateway®; Invitrogen, Carlsbad California). Si dichos sitios no existen, se utilizan adaptadores de oligonucleótido sintéticos o enlazadores de acuerdo con la práctica convencional.

Los promotores son secuencias no traducidas localizadas corriente arriba (5') del codón de inicio de un gen estructural (en general aproximadamente de 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción y traducción de secuencias particulares de ácido nucleico a las que están unidos operativamente. Dichos promotores se encuentran en varias clases: promotores inducibles, constitutivos y represibles (que aumentan los niveles de transcripción en respuesta a la ausencia de un represor). Los promotores inducibles pueden iniciar niveles aumentados de transcripción a partir del DNA bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, o ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio de temperatura.

El fragmento promotor de levadura también sirve como el sitio para la recombinación homóloga y la integración del vector de expresión en el mismo sitio del genoma de la levadura; de manera alternativa, se utiliza un marcador genético como sitio para la recombinación homóloga. La transformación en *Pichia* se describe en Cregg et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3376-3385.

Los ejemplos de promotores adecuados de *Pichia* incluye el AOX1 y el promotor (Cregg et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9:1316-1323); promotor ICL (Menendez et al. (2003) Yeast 20(13):1097-108); promotor gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAP) (Waterham et al. (1997) Gene 186(1):37-44); y promotor FLD1 (Shen et al. (1998) Gene 216(1):93-102). El promotor GAP es un promotor constitutivo fuerte y los promotores AOX y FLD1 son inducibles.

Otros promotores de levadura incluyen ADH1, alcohol deshidrogenasa II, GAL4, PHO3, PHO5, Pyk, y promotores quiméricos derivados de los mismos. Adicionalmente, se pueden utilizar promotores no de levadura tales como promotores de mamífero, insecto, vegetales, de reptil, anfibio, vírico, y aviar. Más típicamente el promotor comprenderá un promotor de mamífero (potencialmente endógeno a los genes expresados) o comprenderá un promotor de levadura o vírico que proporcione la transcripción eficaz en sistemas de levadura.

Los polipéptidos de interés se pueden producir de manera recombinante no solo directamente, sino también con un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, por ejemplo, una secuencia de señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduros. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser parte de la secuencia codificante del polipéptido que se inserta en el vector. La secuencia de señal heteróloga seleccionada es preferentemente la que es reconocida y procesada por medio de una de las rutas convencional disponibles en la célula huésped. Se ha demostrado que la señal pre-pro del factor alfa de *S. cerevisiae* que es eficaz en la secreción de una variedad de proteínas recombinantes de *P. pastoris*. Otras secuencias de señal de levadura incluye la secuencia de señal del factor de emparejamiento alfa, la secuencia de señal de invertasa, y las secuencias de señal derivadas de otros polipéptidos secretados por levaduras. Adicionalmente, estas secuencias de péptidos de señal se pueden modificar para proporcionar una secreción aumentada en sistemas de expresión en levaduras diploides. Otras señales de secreción de interés también incluyen secuencias de señal de mamífero, que pueden ser heterólogas a las proteínas que se van a secretar, o pueden ser una secuencia nativa de la proteína que se va a secretar. Las secuencias de señal incluyen secuencias pre-peptídicas, y en algunos casos pueden incluir secuencias pro-peptídicas. Muchas de dichas secuencias de señal se conocen en la técnica, incluyendo las secuencias de señal que se encuentran en las cadenas de inmunoglobulinas, por ejemplo, secuencia de preprotoxina K28, PHA-E, FACE, human MCP-1, secuencias de señal de seroalbúmina humana, cadena pesada de Ig humana, cadena ligera de Ig humana, y similares. Por ejemplo, véase Hashimoto et. al. Protein Eng 11(2) 75 (1998); y Kobayashi et. al. Therapeutic Apheresis 2(4) 257 (1998).

La transcripción puede aumentarse insertando una secuencia activadora transcripcional en el vector. Estos activadores son elementos cis-actuantes de ADN, habitualmente de aproximadamente 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Los amplificadores transcripcionales son relativamente independientes de su orientación y posición, encontrándose 5' y 3' de la unidad de transcripción, en un intrón, así como en la propia secuencia codificante. El amplificador puede cortarse y empalmarse en el vector de expresión en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante, pero se localiza preferentemente en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión que se utilizan en células huésped eucariotas también pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles

desde 30 del codón de terminación de la traducción, en regiones no traducidas de ADN o ADNc víricos o de eucariotas. Estas regiones contienen segmentos de nucleótido transcritas como fragmentos poliadenilados en la parte sin traducir del ARNm.

5 La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes enumerados anteriormente emplean técnicas de unión convencionales o métodos de PCR/recombinación. Los plásmidos aislados o fragmentos de ADN se escinden, se adaptan, y se vuelven a unir de la forma que se desee para generar los plásmidos necesarios o por medio de métodos de recombinación. Para el análisis para confirmar las secuencias correctas en los plásmidos construidos, se utilizan mezclas de unión para transformar células huésped, y los transformantes satisfactorios se seleccionan por resistencia a antibióticos (por ejemplo, ampicilina o Zeocina) cuando sea apropiado. Se preparan plásmidos a partir de los transformantes, se analizan por digestión de endonucleasas de restricción y/o se secuencian.

15 Como alternativa a la restricción y unión de fragmentos, se pueden utilizar métodos de recombinación basados en sitios att y enzimas de recombinación para insertar secuencias de ADN en un vector. Dichos métodos se describen, por ejemplo, por Landy (1989) *Ann.Rev.Biochem.* 58:913-949;, y se conocen por los expertos en la técnica. Dichos métodos utilizan recombinación de ADN intermolecular que está mediada por una mezcla de proteínas de recombinación codificada por *E. coli* y lambda. La recombinación se produce entre los sitios de unión (att) específicos en las moléculas de ADN que interactúan. Para una descripción de los sitios att véase Weisberg y Landy (1983) *Site-Specific Recombination in Phage Lambda*, in *Lambda II*, Weisberg, ed.(Cold Spring Harbor, NY:Cold Spring Harbor Press), pp. 211-250. Los segmentos de ADN que flanquean los sitios de recombinación se cambian, de manera que después de cada recombinación, los sitios att son secuencias híbridas compuestas de secuencias donadas por cada uno de los vectores parentales. La recombinación se puede producir entre ADN de cualquier topología.

25 Los sitios att se pueden introducir en una secuencia de interés uniendo la secuencia de interés en un vector apropiado; generando un producto PCR que contiene los sitios att B por medio del uso de cebadores específicos; generando una biblioteca de ADNc clonados en un vector apropiado que contiene sitios att,; y similares.

30 Plegamiento, como se utiliza en el presente documento, se refiere a una estructura tridimensional de polipéptidos y proteínas, donde las interacciones entre restos de aminoácidos actúan para estabilizar la estructura. Aunque las interacciones no covalentes son importantes para determinar la estructura, habitualmente las proteínas de interés tendrán enlaces disulfuro covalentes intra y/o intermoleculares formados por dos restos de cisteína. Para las proteínas y polipéptidos de origen natural o derivados y variantes de los mismos, el plegamiento apropiados normalmente la disposición que resulta en una actividad biológica óptima, y puede ser controlado convenientemente por ensayos de actividad, por ejemplo unión de ligando, actividad enzimática, etc.

40 En algunos casos, por ejemplo cuando el producto deseado tiene un origen sintético, los ensayos basados en la actividad biológica serán menos significativos. El plegamiento apropiado de dichas moléculas se puede determinar basándose en las propiedades físicas, consideraciones energéticas, estudios de modelado, y similares.

45 El huésped de expresión puede modificarse adicionalmente por la introducción de secuencias que codifican una o más enzimas que aumentan el plegamiento y la formación de enlaces disulfuro, es decir, plegasas, chaperoninas, etc. Dichas secuencias se pueden expresar constitutivamente o induciblemente en la células huésped de levadura, utilizando vectores, marcadores, etc., como se conoce en la técnica. Preferentemente, las secuencias incluyen elementos reguladores transcripcionales suficientes para el patrón de expresión deseado, se integran establemente en el genoma de la levadura por medio de una metodología de direccionamiento.

50 Por ejemplo, la PDI de eucariota no solo es un catalizador eficaz de la oxidación de cisteína proteica e isomerización de enlaces disulfuro, sino que también presenta actividad chaperona. La co-expresión de PDI puede facilitar la producción de proteínas activas que tienen enlaces disulfuro múltiples. También es interesante la expresión de BIP (proteína de unión de cadena pesada de inmunoglobulina), ciclofilina; y similares. Cada una de las cepas haploides parentales pueden expresar una enzima con distinto plegamiento, por ejemplo, una cepa puede expresar BIP, y la otra cepa puede expresar PDI o una combinación de los mismos.

55 Las expresiones "proteína deseada" o "proteína diana" se utilizan de manera intercambiable y se refieren generalmente a un anticuerpo humanizado o una parte de unión del mismo como se describe en el presente documento. El término "anticuerpo" pretende incluir cualquier estructura molécula que contiene una cadena polipeptídica con una forma específica que se fija y reconoce un epítipo, , donde una o más interacciones de unión no covalentes estabiliza el complejo entre la estructura molecular y el epítipo. La molécula de anticuerpo arquetípica es la inmunoglobulina, y todos los tipos de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, etc., de todas las fuentes, por ejemplo, humanas, de roedores, conejos, vacas, ovejas, cerdos, perros, otros mamíferos, pollos, otras aves, etc., se consideran que son "anticuerpos". Una fuente preferida para producir anticuerpos útiles como material de partida de acuerdo con la invención son los conejos. Se han descrito numerosas secuencias codificantes de anticuerpo; y pueden aparecer otras por métodos bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de los mismos incluyen, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos, y otros anticuerpos de mamíferos no humanos, anticuerpos humanizados,

anticuerpos de cadena sencilla tales como scFv, anticuerpos de camélidos, nanocuerpos, IgNAR (anticuerpos de cadena sencilla derivados de tiburones), agentes inmuno-farmacéuticos modulares pequeños (SMIP), y fragmentos de anticuerpos tales como Fab, Fab', F(ab')₂ y similares. Véase Streltsov VA, et al., Structure of a shark IgNAR antibody variable domain and modeling of an early-developmental isotype, *Protein Sci.* 2005 Nov;14(11):2901-9. Epub 2005 Sep 30; Greenberg AS, et al., A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks, *Nature.* 1995 Mar 9;374(6518):168-73; Nuttall SD, et al., Isolation of the new antigen receptor from wobbegong sharks, and use as a scaffold for the display of protein loop libraries, *Mol Immunol.* Ago. de 2001 ;38(4):313-26; Hamers-Casterman C, et al., Naturally occurring antibodies devoid of light chains, *Nature.* 1993 Jun 3;363(6428):446-8; Gill DS, et al., Biopharmaceutical drug discovery using novel protein scaffolds, *Curr Opin Biotechnol.* Dic de 2006 ;17(6):653-8. Epub 2006 Oct 19.

Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno se pueden producir por modificación genética. En esta técnica, como con otros métodos, las células productoras de anticuerpos se sensibilizan con el antígeno deseado o inmunógeno. El ARN mensajero aislado de las células productoras de anticuerpos se utiliza como una matriz para producir ADNc utilizando una amplificación por PCR. Una biblioteca de vectores, que contiene cada uno un gen de cadena pesada y un gen de cadena ligera mantienen la especificidad antigénica inicial, se produce por secciones apropiadas del ADNc de inmunoglobulina amplificado en vectores de expresión. Se construye una biblioteca combinatoria combinando la biblioteca genética de cadena pesada con la biblioteca genética de cadena ligera. Esto da como resultado una biblioteca de clones que co-expresan una cadena pesada y ligera (parecido al fragmento Fab o fragmento de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo). Los vectores que portan estos genes se co-transfectan en una células huésped. Cuando se induce la síntesis genética de anticuerpos en el huésped transfectado, las proteínas de cadena ligera y pesada se auto-ensamblan para producir anticuerpos activos que se pueden detectar explorando con el antígeno o inmunógeno.

Las secuencias codificantes de anticuerpos de interés incluyen las codificadas por secuencias nativas, así como ácidos nucleicos que, gracias a la degeneración del código genético, no son idénticas en secuencia a los ácidos nucleicos desvelados, y variantes de los mismos. Las variantes polipeptídicas pueden incluir sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácidos (aa). Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras o sustituciones para eliminar aminoácidos no esenciales, tales como los que alteran un sitio de glucosilación, o para minimizar el mal plegamiento o sustitución o eliminación de uno o más restos de cisteína que no son necesarios para la función. Las variantes se pueden diseñar de manera que mantengan o aumenten una actividad biológica de una región particular de la proteína (por ejemplo, un dominio funcional, restos de aminoácidos catalíticos, etc.). Las variantes también incluyen fragmentos de polipéptidos desvelados en el presente documento, particularmente fragmentos biológicamente activos y/o fragmentos correspondientes con dominios funcionales. Las técnicas para mutagénesis in vitro de los genes clonados se conocen. También se describen polipéptidos que se han modificado utilizando técnicas de biología molecular habituales de manera que mejoren su resistencia a degradación proteolítica o para optimizar las propiedades de solubilidad o para hacerlos más adecuados como agentes terapéuticos.

Se pueden producir anticuerpos quiméricos por medios recombinantes combinando las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada (V_L y V_H), que se obtienen de células que producen anticuerpos de una especie con las regiones constantes de cadena pesada y ligera de otra. Normalmente, los anticuerpos quiméricos utilizan regiones variables de roedores o conejo y regiones constantes humanas, con el fin de producir un anticuerpo con dominios predominantemente humanos. La producción de dichos anticuerpos quiméricos se conoce bien en la técnica, y se puede conseguir por medios convencionales (como se describe, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. N° 5.624.659). Se contempla adicionalmente que las regiones constantes humanas de los anticuerpos quiméricos de la invención se pueden seleccionar de entre regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5, IgG6, IgG7, IgG8, IgG9, IgG10, IgG11, IgG12, IgG13, IgG14, IgG15, IgG16, IgG17, IgG18 o IgG19.

Los anticuerpos humanizados se modifican para que contengan más dominios de inmunoglobulina tipo humano, e incorporan solo las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo derivado de animales. Esto se consigue examinando cuidadosamente la secuencia de los bucles hipervariables de las regiones variables del anticuerpo monoclonal y ajustándolos a la estructura de las cadenas de anticuerpo humano. Aunque aparentemente complejo, el proceso es sencillo en la práctica. Véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. N° 6.187.287.

Además de inmunoglobulinas completas (o sus equivalentes recombinantes) se pueden sintetizar fragmentos de inmunoglobulina que comprenden el sitio de unión al epítipo (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ u otros fragmentos). "Fragmento", o inmunoglobulinas mínimas se pueden diseñar utilizando técnicas de inmunoglobulina recombinantes. Por ejemplo, las inmunoglobulinas "Fv" se pueden utilizar sintetizando una región variable de cadena ligera fusionada con una región variable de cadena pesada. Las combinaciones de anticuerpos también tienen interés, por ejemplo, los diacuerpos, que comprenden dos especificidades distintas de Fv. En otra realización de la invención, se engloban los SIMP (agentes inmuno-farmacéuticos de molécula pequeña), camelicuerpos, nanocuerpos, e IgNAR en los fragmentos de inmunoglobulina.

Las inmunoglobulinas y fragmentos de las mismas se pueden modificar post-traduccionalmente, por ejemplo, añadiendo restos efectoros tales como enlazadores químicos, restos detectables, tales como colorantes

fluorescentes, enzimas, toxinas, sustratos, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, restos quimioluminiscentes y similares, o se pueden utilizar restos de unión específica, tales como estreptavidina, avidina o biotina, y similares en los métodos y composiciones de la presente invención. Ejemplos de moléculas efectoras adicionales se proporcionan posteriormente.

5 La expresión "levadura poliploide que expresa establemente o expresa un polipéptido heterólogo secretado deseado durante un tiempo prolongado" se refiere a un cultivo de levaduras que secreta dicho polipéptido durante al menos varios días a una semana, más preferentemente al menos un mes, incluso más preferentemente al menos 1-6 meses, e incluso más preferentemente durante más de un año a niveles de expresión con un umbral, normalmente
10 al menos de 10-25 mg/litro y preferentemente sustancialmente mayores.

La expresión "cultivo de levadura poliploide que secreta cantidades deseadas de polipéptido recombinante" se refiere a cultivos que secretan establemente o durante periodos prolongados al menos 10-25 mg/litro de polipéptidos heterólogos, más preferentemente al menos 50-500 mg/litro, y más preferentemente 500-1000 mg/litro o más.

15 Una secuencia de polinucleótido "se corresponde" con una secuencia de polipéptido se la traducción de la secuencia de polinucleótido de acuerdo con el código genético da lugar a la secuencia de polipéptido (es decir, la secuencia de polinucleótido "codifica" la secuencia de polipéptido), una secuencia de polinucleótido "se corresponde" con otra secuencia de polinucleótido si las dos secuencias codifican la misma secuencia de polipéptido.

20 Una región o dominio "heterólogos" de una construcción de ADN es un segmento identificable de ADN en una molécula de ADN mayor que no se encuentra asociada con la molécula mayor en la naturaleza. Por lo tanto, cuando la región heteróloga codifica un gen de mamífero, el gen estará habitualmente flanqueado por un ADN que no flanquea el ADN genómico de mamífero en el genoma del organismo de origen. Otro ejemplo de una región heteróloga es una construcción en la que la propia secuencia codificante no se encuentra en la naturaleza (por
25 ejemplo, un ADNc donde la secuencia codificante genómica contiene intrones, o secuencias sintéticas que tienen codones diferentes al gen nativo). Las variaciones alélicas de eventos mutacionales de origen natural no dan lugar a una región heteróloga de ADN como se define en el presente documento.

30 Una "secuencia codificante" es una secuencia en fase de codones que (en vista del código genético) se corresponde con o codifica una secuencia proteica o peptídica. Dos secuencias codificantes se corresponden entre ellas si las secuencias o sus secuencias complementarias codifican las mismas secuencias de aminoácidos. Una secuencia codificante asociada con las secuencias reguladoras apropiadas se pueden transcribir y traducir en un polipéptido. Habitualmente se localizarán una señal de poliadenilación y una secuencia de terminación de la transcripción 3' de la secuencia codificante. Una "secuencia promotora" es una región de ADN reguladora capaz de unirse a la ARN
35 polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante corriente abajo (en dirección 3'). Las secuencias promotoras normalmente contienen sitios adicionales para unirse a las moléculas reguladoras (por ejemplo, factores de transcripción) que afectan a la transcripción de la secuencia codificante. Una secuencia codificante está "bajo el control" de una secuencia promotora o esta "unida operativamente" al promotor cuando la ARN polimerasa se une a la secuencia promotora en una célula y transcribe la secuencia codificante en ARNm, que luego a su vez se traduce en la proteína codificada por la secuencia codificante.

Se utilizan vectores para introducir una sustancia ajena, tal como ADN, ARN o proteínas, en un organismo o célula huésped. Los vectores típicos incluyen virus recombinantes (para polinucleótidos) y liposomas (para polipéptidos).
45 Un "vector ADN" es un replicón, tal como un plásmido, fago o cósmido, al que se puede unir otro segmento de polinucleótido, de manera que se lleva a cabo la replicación del segmento unido. Un "vector de expresión" es un vector ADN que contiene secuencias reguladoras que dirigirán la síntesis del polipéptido por una célula huésped apropiada. Esto habitualmente significa un promotor para unir la ARN polimerasa e iniciar la transcripción de ARNm, así como sitios de unión al ribosoma y señales de iniciación para dirigir la traducción del ARNm en un polipéptido(s).
50 La incorporación de una secuencia de polinucleótido en un vector de expresión en el sitio apropiado y en una fase de lectura correcta, seguido por la transformación de una célula huésped apropiada por el vector, hace posible la producción de un polipéptido codificado por dicha secuencia de polinucleótido.

"Amplificación" de secuencias de polinucleótido es la producción in vitro de múltiples copias de una secuencia de ácido nucleico particular. La secuencia amplificada está habitualmente en forma de ADN. Se ha descrito una variedad de técnicas para llevar a cabo dicha amplificación en un artículo de revisión de Van Brunt (1990, Bio/Technol., 8(4):291-294). La reacción en cadena de polimerasa o PCR es un prototipo de amplificación de ácidos nucleicos, y el uso de la PCR en el presente documento se debería considerar ejemplar de otras técnicas de amplificación adecuadas.

60 La estructura general de los anticuerpos en vertebrados se entiende bien ahora (Edelman, G. M., Ann. N.Y. Acad. Sci., 190: 5 (1971)). Los anticuerpos consisten en dos cadenas de polipéptido ligeras idénticas de un peso molecular de aproximadamente 23.000 Daltons (la "cadena ligera"), y dos cadenas pesadas idénticas de peso molecular 53.000-70.000 (la "cadena pesada"). Las cuatro cadenas se unen por enlaces disulfuro en una configuración en "Y" en donde las cadenas ligeras se unen a las cadenas pesadas que comienzan en la boca de la configuración en "Y".
65 La parte "ramificada" de la configuración en "Y" se designa región F_{ab}; la parte del tallo de la configuración en "Y" se

designa como región Fc. La orientación de la secuencia de aminoácidos recorre desde el extremo N en la parte superior de la configuración en "Y" hasta el extremo C en el fondo de cada cadena. El extremo N posee la región variable que tiene la especificidad por el antígeno que los produce, y tiene aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, habiendo ligeras variaciones entre la cadena ligera y pesada y de anticuerpo a anticuerpo.

5 La región variable se une en cada cadena a una región constante que extiende la longitud restante de la cadena y que en una clase particular de anticuerpo no varía con la especificidad del anticuerpo (es decir, el antígeno lo produce). Hay cinco clases principales conocidas de regiones constantes que determinan la clase de la molécula de inmunoglobulina (IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE que se corresponden con regiones constantes de cadena pesada γ , μ , α , δ y ϵ (gamma, mu, alfa, delta, o épsilon)). La región constante o clase determina una función efectora posterior del anticuerpo, incluyendo la activación del complemento (Kabat, E. A., Structural Concepts in Immunology and Immunochimistry, 2ª Ed., p. 413-436, Holt, Rinehart, Winston (1976)), y otras respuestas celulares (Andrews, D. W., et al., Clinical Immunobiology, pp 1-18, W. B. Sanders (1980); Kohl, S., et al., Immunology, 48: 187 (1983)); aunque la región variable determina el antígeno con el que reaccionarán. Las cadenas ligeras se clasifican como κ (kappa) o λ (lambda). Cada clase de cadena pesada se puede emparejar con cualquier cadena ligera kappa o lambda. Las cadenas ligeras y pesadas se unen covalentemente entre ellas, y las porciones de "cola" de las dos cadenas pesadas se unen entre ellas por uniones disulfuro covalentes cuando las inmunoglobulinas se generan en hibridomas o por células B.

20 La expresión "región variable" o "VR" se refiere a los dominios de cada par de cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo que están implicadas directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) en un extremo y un dominio constante en su otro extremo, el dominio constante de cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada.

30 Las expresiones "región determinante de complementariedad", "región hipervariable" o "CDR" se refiere a una o más de las regiones hiper-variables o determinantes de complementariedad (CDR) que se encuentran en las regiones variables de cadenas pesadas o ligeras de un anticuerpo (Véase Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., (1987)). Estas expresiones incluyen las regiones hipervariables como las define Kabat et al. ("Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat E., et al., US Dept. of Health and Human Services, 1983) o los bucles hipervariables en las estructuras tridimensionales de los anticuerpos (Chothia y Lesk, J Mol. Biol. 196 901-917 (1987)). Las CDR de cada cadena se mantienen en estrecha proximidad por las regiones marco conservadas y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno. En las CDR hay aminoácidos seleccionados que se han descrito como regiones determinantes de selectividad (SDR) que representan los restos de contacto críticos que utilizan las CDR en la interacción anticuerpo-antígeno (Kashmiri, S., Methods, 36:25-34 (2005)).

40 Las expresiones "región marco conservada" o "FR" se refiere a una o más de las regiones marco conservadas en las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo (Véase Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, Md., (1987)). Estas expresiones incluyen las regiones de secuencia de aminoácidos interpuestas entre las CDR en las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo.

45 *Anticuerpos anti-IL-6 y fragmentos de unión de los mismos*

La invención incluye anticuerpos que tienen especificidad de unión por IL-6 y poseen una secuencia variable de cadena ligera que comprende la secuencia expuesta a continuación:

MDTRAPTQLLGLLLLWLPGARCA YDMTQTPASVSAAVGGTVTIKCQASQSINNEL
 SWYQQKPGQRPKLLIYRASTLASGVSSRFKSGSGTEFTLTISDLECA DAATYYCQ
 QGYSLRNIDNAFGGGTEVVVKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN (SEQ
 50 ID NO: 2).

La invención también incluye anticuerpos que tienen una especificidad de unión por IL-6 y poseen una secuencia variable de cadena pesada que comprende la secuencia expuesta a continuación:

**METGLRWLLLVAVLKGVCQCSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLSNYYVTWV
RQAPGKGLEWIGIHYGSDETAYATWAIGRFTISKSTSTTVDLKMTSLTAADTATYFC
ARDDSSDWDKFNWLGQGTLVTVSSASTKGPVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
(SEQ ID NO: 3).**

- 5 La invención contempla adicionalmente anticuerpos que comprenden las secuencias polipeptídicas de SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; y SEQ ID NO: 6 que se corresponde con las regiones determinantes de complementariedad (CDR, o regiones hipervariables) de la secuencia variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2, y las secuencias polipeptídicas de SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; y SEQ ID NO: 9 que se corresponden con las regiones determinantes de complementariedad (CDR, o regiones hipervariables) de la secuencia variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3.
- 10 En otra realización, la invención contempla otros anticuerpos, tales como por ejemplo, anticuerpos quiméricos que comprenden las secuencias polipeptídicas de SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; y SEQ ID NO: 6 que se corresponden con las regiones determinantes de complementariedad (CDR, o regiones hipervariables) de la secuencia variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2, y las secuencias polipeptídicas de SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; y SEQ ID NO: 9 que se corresponden con las regiones determinantes de complementariedad (CDR, o regiones hipervariables) de la secuencia variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3.
- 15 La invención contempla también fragmentos del anticuerpo que tienen una especificidad de unión por IL-6. En una realización de la invención, los fragmentos de anticuerpo de la invención comprenden, o alternativamente consisten, en la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 2, y comprenden, o alternativamente consisten, en la secuencia polipeptídica de SEQ ID NO: 3.
- 20 La invención también contempla fragmentos de los anticuerpos que tienen especificidad de unión por IL-6 donde los fragmentos comprenden, o alternativamente consisten en, todos los siguientes fragmentos de anticuerpo: la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2, la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3; las regiones determinantes de complementariedad (SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; y SEQ ID NO: 6) de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2; y las regiones determinantes de complementariedad (SEQ ID NO: 7; SEQ ID NO: 8; y SEQ ID NO: 9) de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3.
- 25 La invención también contempla variantes donde cualquiera de las secuencias polipeptídicas de cadena pesada de SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19 se sustituyen por la secuencia polipeptídica de cadena pesada de SEQ ID NO: 3; y la secuencia polipeptídica de cadena ligera de SEQ ID NO: 20 se sustituye por la secuencia polipeptídica de cadena ligera de SEQ ID NO: 2. La secuencia de CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 120 se puede sustituir por la secuencia CDR de cadena pesada de SEQ ID NO: 8.
- 30 En una realización preferida de la invención, el anticuerpo anti-IL-6 es Ab1, que comprende SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, o SEQ ID NO alternativos expuestos en el párrafo [0084] posterior, y que tienen al menos una de las actividades biológicas expuestas en el presente documento.
- 35 En otra realización, la invención contempla un anticuerpo anti-IL-6 aislado que comprende una secuencia polipeptídica V_H seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEQ ID NO: 3, 18, y 19; y además comprende una secuencia polipeptídica V_L seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEQ ID NO: 2 y 20 o una variante de las mismas donde uno o más de los restos de la región marco conservada (restos FR) de dicho polipéptido V_H o V_L se ha sustituido con otro resto de aminoácido dando como resultado un anticuerpo anti-IL-6 que se une específicamente a IL-6. La invención contempla formas humanizadas y quiméricas de estos anticuerpos. Los anticuerpos quiméricos pueden incluir un derivado Fc de las regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5, IgG6, IgG7, IgG8, IgG9, IgG10, IgG11, IgG12, IgG13, IgG14, IgG15, IgG16, IgG17, IgG18 o IgG19.
- 40 En una realización de la invención, los anticuerpos o polipéptidos V_H o V_L se originan o se seleccionan de una o más poblaciones de células B de conejo antes del inicio del proceso de humanización al que se hace referencia en el presente documento.
- 45 En otra realización de la invención, los anticuerpos anti-IL-6 y fragmentos de los mismos tienen especificidad de unión por homólogos de primate de la proteína IL-6 humana. Ejemplos no limitantes de homólogos de primates de la proteína IL-6 humana son IL-6 obtenidas de *Macaca fascicularis* (también conocido como mono *Cynomolgus*) y el mono Rhesus. En otra realización de la invención, los anticuerpos anti-IL-6 y los fragmentos de los mismos inhiben la asociación de IL-6 con el IL-6R, y/o la producción de complejos IL-6/IL-6R/gp130 y/o la producción de multímeros IL-6/IL-6R/gp130 y/o antagonizan los efectos biológicos de uno o más de los siguientes.
- 50 Como se establece en el párrafo [0062] en el presente documento, los anticuerpos y fragmentos de los mismos se pueden modificar post-traduccionalmente para añadir restos efectores tales como enlazadores químicos, restos
- 55
- 60

detectables tales como o ejemplo colorantes fluorescentes, enzimas, sustratos, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, y restos quimioluminiscentes, o restos funcionales tales como por ejemplo, estreptavidina, avidina, biotina, una citotoxina, un agente citotóxico, y materiales radioactivos.

- 5 Con respecto a los restos detectables, enzimas ejemplares adicionales incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano rusticano, acetilcolinesterasa, fosfatasa alcalina, *beta*-galactosidasa y luciferasa. Los materiales fluorescentes ejemplares adicionales incluyen, pero no se limitan a, rodamina, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, umbeliferona, diclorotriacilamina, ficoeritrina y cloruro de dansilo. Los restos quimioluminiscentes ejemplares adicionales incluyen, pero no se limitan a, luminol. Materiales bioluminiscentes ejemplares adicionales
10 incluyen, pero no se limitan a, luciferina y aecurina. Materiales radiactivos ejemplares adicionales incluyen, pero no se limitan a, Yodo 125 (¹²⁵I), Carbono 14 (¹⁴C), Azufre 35 (³⁵S), Tritio (³H) y Fosforo 32 (³²P).

- Con respecto a los restos funcionales, los agentes citotóxicos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, aminopterina, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo descabacina; agentes alquilantes tales
15 como mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), mitomicina C, lomustina (CCNU) 1-metilnitrosourea, ciclofosfamida, mecloretamina, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino y carboplatino (para platino); antraciclinas que incluyen daunorrubicina (anteriormente daunomicina), doxorubicina (adriamicina) detorrubicina, carminomicina, idarrubicina, epirubicina, mitoxantrona y bisantreno; antibióticos que incluyen actinomicina (actinomicina D), bleomicina, caliqueamicina,
20 mitramicina, y antramycin (AMC); y agentes antimicóticos tales como los alcaloides de la vinca, vincristina y vinblastina. Otros agentes citotóxicos incluyen paclitaxel (taxol), ricino, exotoxina de *Pseudomonas*, gemcitabina, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, etopósido, tenopósido, colchicina, dihidroxiantracindiona, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol, puromicina, procarbacin, hidroxiaurea, asparaginasa, corticosteroides, mitotano (O-P'-DDD), interferones y mezclas de estos agentes
25 citotóxicos.

- Agentes citotóxicos adicionales incluyen, pero no se limitan a, agentes quimioterápicos tales como carboplatino, cisplatino, paclitaxel, gemcitabina, caliceamicina, doxorubicina, 5-fluorouracilo, mitomicina C, actinomicina D, ciclofosfamida, vincristina, y bleomicina. Las enzimas tóxicas de plantas y bacterias tales como ricino, toxina diftérica
30 y toxina de *Pseudomonas* se pueden conjugar con anticuerpo humanizados, o fragmentos de unión de los mismos, para generar reactivos citotóxicos específicos del tipo celular (Youle, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:5483 (1980); Gilliland, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:4539 (1980); Krolick, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77:5419 (1980)).

- Otros agentes citotóxicos incluyen ribonucleasas como describe Goldenberg en la Pat. de EE. UU. Nº 6.653.104. Ciertas realizaciones de la invención también se refieren a inmunocombinados en los que un radionúclido que emite partículas alfa o beta se acopla establemente al anticuerpo, o fragmentos de unión del mismo, con o sin el uso de un agente formador de complejos. Dichos radionúclidos incluyen emisores beta tales como Fosforo-32 (³²P), Scandio-47 (⁴⁷Sc), Cobre-67 (⁶⁷Cu), Galio-67 (⁶⁷Ga), Ytrio-88 (⁸⁸Y), Ytrio-90 (⁹⁰Y), Yodo-125 (¹²⁵I), Yodo-131 (¹³¹I), Samario-153 (¹⁵³Sm), Lutecio-177 (¹⁷⁷Lu), Rhenio-186 (¹⁸⁶Re) o Rhenio-188 (¹⁸⁸Re), y emisores alfa tales como Astatio-211 (²¹¹At), Plomo-212 (²¹²Pb), Bismuto-212 (²¹²Bi) o Bismuto-213 (²¹³Bi) o Actinio-225 (²²⁵Ac).
40

- Se conocen métodos en la técnica para conjugar un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo a un resto detectable y similares, tales como, por ejemplo, los métodos descritos por Hunter et al, Nature 144:945 (1962); David et al, Biochemistry 13:1014 (1974); Pain et al, J. Immunol. Meth. 40:219 (1981); y Nygren, J., Histochem. and Cytochem. 30:407 (1982).
45

- Las realizaciones descritas en el presente documento incluyen adicionalmente variantes y equivalentes que son sustancialmente homologas a los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, diacuerpos, SMIP, camelicuerpos, nanocuerpos, IgNAR, polipéptidos, regiones variables y CDR expuestos en el presente documento. Estos pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustitución conservadoras, (es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares). Por ejemplo, sustitución conservadora se refiere a la sustitución de un aminoácido con otro con la misma clase general, por ejemplo, un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido, un aminoácido básico con otro aminoácido básico, o un aminoácido neutro con otro aminoácido neutro. Lo que se entiende por una
50 sustitución de aminoácidos conservadora se conoce bien en la técnica.

- En otra realización, la invención contempla secuencias polipeptídicas que tienen al menos un 90 % o más de homología de secuencia con cualquiera o más de las secuencias polipeptídicas de fragmentos de anticuerpo, regiones variables y CDR expuestas en el presente documento, Más preferentemente, la invención contempla secuencias polipeptídicas que tienen al menos un 95 % o más de homología de secuencia, incluso más preferentemente al menos un 98 % o más de homología de secuencia, y aún más preferentemente al menos un 99 % o más de homología de secuencia con una cualquiera o más de las secuencias polipeptídicas de fragmentos de anticuerpo, regiones variables y CDR que se exponen en el presente documento. Los métodos para determinar la homología entre secuencias de ácido nucleico y aminoácidos son bien conocidos por los expertos habituados en la
60 técnica.
65

También se describen los homólogos de polipéptidos mencionados anteriormente de los fragmentos de anticuerpo, regiones variables y CDR expuestos en el presente documento que tienen adicionalmente actividad anti-IL-6. Ejemplos no limitantes de actividad anti-IL-6 se exponen en el presente documento, por ejemplo, en los párrafos [0731]-[0736] posteriormente.

5 Se describen en el presente documento la generación y uso de anticuerpos anti-idiotípicos que se unen a cualquiera de las secuencias anteriores. En una realización ejemplar, dicho anticuerpo anti-idiotípico se podría administrar a un sujeto que ha recibido un anticuerpo anti-IL-6 para modular, reducir o neutralizar, el efecto del anticuerpo anti-IL-6. Dichos anticuerpos anti-idiotípicos podrían ser útiles también en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria que se caracterice por la presencia de anticuerpos anti-IL-6. Un uso ejemplar adicional de dichos anticuerpos anti-idiotípicos es para la detección de los anticuerpos anti-IL-6 de la presente invención, por ejemplo para comprobar los niveles de los anticuerpos anti-IL-6 presentes en la sangre u otros fluidos corporales del sujeto.

15 También se describen anticuerpos anti-IL-6 que comprenden cualquiera de las secuencias de polipéptido o polinucleótido descritas en el presente documento sustituidas por cualquiera de otras secuencias de polinucleótido descritas en el presente documento. Por ejemplo, sin limitación a esto, la presente invención contempla anticuerpos que comprenden la combinación de cualquiera de las secuencias variables de cadena ligera y variable de cadena pesada descritas en el presente documento, y además contempla anticuerpos que resultan de la sustitución de cualquiera de las secuencias CDR descritas en el presente documento por cualquiera de otras secuencias CDR
20 descritas en el presente documento.

Realizaciones ejemplares adicionales de la invención

25 En otra realización, la invención contempla uno o más anticuerpos anti-IL-6 humana o fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente al mismo epítipo(s) lineal o conformacional y/o compite por la unión al mismo epítipo(s) lineal o conformacional en un polipéptido IL-6 humano intacto o un fragmento del mismo como un anticuerpo anti-IL-6 humana que es el Ab1.

30 En otra realización de la invención, el anticuerpo anti-IL-6 humana que se une específicamente al mismo epítipo(s) lineal o conformacional en un polipéptido IL-6 intacto o fragmento del mismo se une(n) específicamente a Ab1 unido a un epítipo(s) IL-6 como se cerciora por mapeo epitópico utilizando fragmentos peptídicos lineales solapados que abarcan la longitud completa del polipéptido IL-6 humano nativo. En una realización de la invención, el epítipo de IL-6 comprende, o alternativamente consiste en, uno o más restos comprendidos en los fragmentos de IL-6 seleccionados de entre los que engloban respectivamente los restos de aminoácidos 37-51, restos de aminoácidos 70-84, restos de aminoácidos 169-183, restos de aminoácidos 31-45 y/o restos de aminoácidos 58-72.

40 La invención se refiere también a un anticuerpo anti-IL-6 que se une con el mismo epítipo IL-6 y/o compite con un anticuerpo anti-IL-6 por la unión a IL-6 como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo desvelado en el presente documento, incluyendo pero sin limitarse a un anticuerpo anti-IL-6 que es Ab1.

45 En otra realización, la invención se refiere también a un anticuerpo anti-IL-6 aislado o fragmento de anticuerpo que comprende una o más de las CDR contenidas en las secuencias polipeptídicas V_H seleccionadas de entre el grupo que consiste en: SEQ ID NO: 3, 18 y 19, y una o más de las CDR contenidas en la secuencia polipeptídica V_L que consisten en 2 y 20.

50 La invención contempla adicionalmente que el uno o más anticuerpos anti-IL-6 humana que se ha tratado anteriormente esté aglucosilado; que contenga una región Fc que se ha modificado para alterar la función efectora, semivida, proteólisis, y/o glucosilación; sea humano, humanizado, de cadena sencilla o quimérico; y que sea un anticuerpo humanizado derivado de un anticuerpo de conejo (parental anti-IL-6 humana).

55 La invención contempla además uno o más anticuerpos anti-IL-6 humana donde las regiones marco conservadas (FR) de la región variable ligera y la región variable pesada de dicho anticuerpo respectivamente son FR humanas que no están modificadas o que se han modificado por sustitución de como mucho 2 o 3 restos de FR humanos y de la región variable de cadena ligera o pesada con los restos FR correspondientes del anticuerpo de conejo parental, y donde dichas FR humanas se han derivado de secuencias de anticuerpo variables de cadena pesada y ligera humanas que se han seleccionad de un biblioteca de secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana basándose en sus altos niveles de homología con las regiones variables de cadena pesada o ligera de conejo con respecto a otras secuencias de anticuerpo de la línea germinal humana contenidas en la biblioteca.

60 En una realización de la invención, el anticuerpo anti-IL-6 humana o fragmento se une específicamente a células que expresan IL-6 humana y/o a moléculas de IL-6 solubles circulantes in vivo, incluyendo la IL-6 expresada sobre o por células humanas en un paciente con una enfermedad asociada con las células que expresan IL-6.

65 En otra realización, la enfermedad se selecciona de entre fatiga general, fatiga inducida por el ejercicio, fatiga relacionada con el cáncer, fatiga relacionada con una enfermedad inflamatoria, síndrome de fatiga crónica, caquexia relacionada con el cáncer, caquexia relacionada con enfermedad cardíaca, caquexia relacionada con enfermedad

respiratoria, caquexia relacionada con enfermedad renal, caquexia relacionada con la edad, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES), artritis idiopática juvenil, psoriasis, artropatía psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), polimialgia reumática, arteritis de células gigantes, vasculitis autoinmunitaria, enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD), síndrome de Sjögren, enfermedad de Still de aparición adulta, artritis reumatoide, linfoma de Hodgkin sistémico, linfoma no de Hodgkin, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de células renales, enfermedad de Castleman multicéntrica, cáncer ovárico, resistencia a fármacos en quimioterapia contra el cáncer, toxicidad a la quimioterapia contra el cáncer, enfermedad cardíaca isquémica, aterosclerosis, obesidad, diabetes, asma, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad cerebrovascular, fiebre, respuesta en fase aguda, alergias, anemia, anemia inflamatoria (anemia de enfermedad crónica), hipertensión, depresión, depresión asociada con enfermedad crónica, trombosis, trombocitosis, fallo cardíaco agudo, síndrome metabólico, aborto espontáneo, obesidad, prostatitis crónica, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria pélvica, lesión por re-perfusión, rechazo de trasplantes, enfermedad de injerto contra el huésped (GVHD), gripe aviar, varicela, gripe pandémica, síndrome de disfunción respiratoria del adulto (SDRA) síndrome respiratorio agudo severo (SARS), sepsis, cáncer, trastorno inflamatorio, trastorno vírico, o trastorno autoinmunitario. En una realización particularmente preferida, la enfermedad es artritis, caquexia, y enfermedad debilitante.

La invención contempla además anticuerpos anti-IL-6 humana unidos directa o indirectamente a un marcador detectable o agente terapéutico.

La invención también contempla una o más secuencias de aminoácidos que dan como resultado la expresión de un anticuerpo anti-IL-6 humana o fragmento de anticuerpo como se ha expuesto anteriormente, incluyendo los que comprenden, o alternativamente consisten en, codones preferidos humanos o de levadura. La invención también contempla vectores (que incluyen plásmidos o vectores víricos recombinantes) que comprenden dichas secuencias de ácido nucleico. La invención también contempla células huésped o células huésped recombinantes que expresan al menos uno de los anticuerpos expuestos anteriormente, incluyendo células de mamífero, levadura, bacterianas y de insecto.. La célula huésped puede ser una célula de levadura. La célula de levadura puede ser una célula de levadura diploide, La células de levadura puede ser una levadura *Pichia*.

La invención también contempla anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno para su uso en un método de tratamiento que comprende la administración a un paciente con una enfermedad o afección con células que expresan IL-6 una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti-IL-6 humana o fragmento. las enfermedades que se pueden tratar se presentan en la lista no limitante expuesta anteriormente. En una realización preferida, la enfermedad se selecciona de entre un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, o afección inflamatoria. En una realización particularmente preferida, la enfermedad es cáncer o infección vírica. En otra realización el tratamiento incluye además la administración de otro agente terapéutico que se selecciona de entre quimioterapia, radioterapia, administración de citocinas o terapia genética.

La divulgación contempla además un método de formación de imágenes in vivo que detecta la presencia de células que expresan IL-6 administrando una cantidad diagnósticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti-IL-6 humana. En una realización, dicha administración incluye además la administración de un radionúclido o fluoróforo que facilita la detección del anticuerpo a los sitios de la enfermedad que expresan IL-6. En otra realización de la divulgación el método de formación de imágenes in vivo se utiliza para detectar tumores que expresan IL-6 o metástasis o se utiliza para detectar la presencia de sitios con trastornos autoinmunitarios asociados con células que expresan IL-6. En una realización adicional, los resultados de dicho método de formación de imágenes in vivo se utiliza para facilitar el diseño de un régimen terapéutico apropiado, incluyendo regímenes terapéuticos que incluyen radioterapia, quimioterapia o una combinación de las mismas

Polinucleótidos que codifican anticuerpos polipeptídicos anti-IL-6

La invención se refiere adicionalmente a polinucleótidos que codifican los anticuerpos que tienen especificidad de unión para IL-6. En una realización de la invención, los polinucleótidos de la invención comprenden la siguiente secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia polipeptídica variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2:

ATGGACACGAGGGCCCCACTCAGCTGCTGGGGCTCCTGCTGCTCTG
 GCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCTATGATATGACCCAGACTCCAGCCTCGGTGTC
 TGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATT
 ACAATGAATTATCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCGTCCCAAGCTCTG
 ATCTATAGGGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGT
 GGATCTGGGACAGAGTTCCTCACCATCAGCGACCTGGAGTGTGCCGATGC
 TGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTTATAGTCTGAGGAATATTGATAATGCTTT
 CGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAACGTACGGTAGCGGCCCCATCTGTCT
 TCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGT
 GCCTGCTGAATAACTT (SEQ ID NO: 10)

En otra realización de la invención, los polinucleótidos de la invención comprenden la siguiente secuencia de polinucleótido que codifica la secuencia polipeptídica variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3:

5

ATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTCTCCTGGTCGCTGTGCTCAAAGG
 TGTCCAGTGTGAGTCGCTGGAGGAGTCCGGGGGTCGCTGGTCACGCCTGGGA
 CACCCCTGACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGTAACTACTAG
 TGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGGAATCATT
 TATGGTAGTGATGAAACGGCCTACGCGACCTGGGCGATAGGCCGATTACCCAT
 CTCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGG
 ACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAGAGATGATAGTAGTACTGGGATGCAAAA
 TTTAACTTGTGGGGCCAAGGCACCCTGGTCACCGTCTCGAGCGCCTCCACCAA
 GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCAAAGAGCACCTCTGGGGGCAC
 AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG (SEQ ID NO: 11).

10 En una realización adicional de la invención, los polinucleótidos que codifican fragmentos del anticuerpo que tiene especificidad de unión para IL-6 comprende una o más de las secuencias de polinucleótido de SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; y SEQ ID NO: 14 que se corresponden con polinucleótidos que codifican las regiones determinantes de complementariedad (CDR o regiones hipervariables) de la secuencia variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2.

15 En una realización adicional de la invención, los polinucleótidos que codifican fragmentos del anticuerpos que tienen especificidad de unión para IL-6 comprende una o más de las secuencias de nucleótido de SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; y SEQ ID NO: 17 que se corresponde con los polinucleótidos que codifican las regiones determinantes de complementariedad (CDR o regiones hipervariables) de la secuencia variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3.

20 La invención también contempla secuencias de polinucleótido que incluyen una o más de las secuencias de polinucleótido que codifica los fragmentos de anticuerpo descritos en el presente documento. En una realización de la invención, los polinucleótidos que codifican fragmentos del anticuerpo que tienen especificidad de unión para IL-6 comprende uno, dos, tres o más, incluso todos los siguientes polinucleótidos que codifican fragmentos de anticuerpo: el polinucleótidos de SEQ ID NO: 10 que codifica la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2; el polinucleótido de SEQ ID NO: 11 que codifica la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 3; polinucleótidos que codifican las regiones determinantes de complementariedad (SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 13; y SEQ ID NO: 14) de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 10; y polinucleótidos que codifican las regiones determinantes de complementariedad (SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 16; y SEQ ID NO: 17) de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 11.

30 En una realización, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos V_H de anticuerpo anti-IL-6 que se selecciona de entre SEQ ID NO: 3, 18, y 19 o codifica una variante de los ismos en donde al menos un resto de región marco conservada (resto de FR) se ha sustituido con un aminoácido presente en la posición correspondiente en un polipéptido V_H del anticuerpo anti-IL-6 de conejo o una sustitución de aminoácidos conservadora.

35 En otra realización, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos V_L de anticuerpo anti-IL-6 de 2 y 20 o que codifica una variante de los mismos en donde al menos un resto de la región marco conservada (resto de FR) se ha sustituido con un

aminoácido presente en la posición correspondiente en un polipéptido V_L de un anticuerpo anti-IL-6 de conejo o una sustitución de aminoácidos conservadora.

También se contemplan células huésped y vectores que comprenden dichos polinucleótidos.

5 La invención contempla además vectores que comprenden las secuencias de polinucleótido que codifica secuencias de polipéptido de cadena pesada y ligera, así como las regiones determinantes de complementariedad (CDR o regiones hipervariables) individuales que se exponen en el presente documento, así como las células huésped que comprenden dichas secuencias. La célula huésped puede ser una célula de levadura. La célula huésped de levadura puede pertenecer al género *Pichia*.

Actividad anti-IL-6

15 Como se ha establecido anteriormente, la IL-6 es un miembro de una familia de citocinas que promueven respuestas celulares por medio de un complejo receptor que consiste al menos en una subunidad de la glucoproteína transductora de la señal gp130 y el receptor IL-6 (IL-6R). El IL-6R también puede estar presente en forma soluble (sIL-6R). La IL-6 se une a IL-6R, que luego dimeriza el receptor transductor de señal gp130.

20 Se cree que los anticuerpos anti-IL-6 de la invención, o los fragmentos de unión a IL-6 de los mismos, son útiles por presentar actividad anti-IL-6. En una realización no limitante de la invención, los anticuerpos anti-IL-6 de la invención, o fragmentos de unión a IL-6 de los mismos, presentan una actividad anti-IL-6 por la unión a IL-6 que puede ser IL-6 soluble o IL-6 expresada en la superficie celular y/o puede evitar o inhibir la unión de IL-6 a IL-6R y/o la activación (dimerización) de la glucoproteína transductora de señal gp130 y la formación de multímeros IL-6/IL-6R/gp130 y los efectos biológicos de cualquiera de los anteriores. Los anticuerpos IL-6 en cuestión puede poseer diferentes actividades antagonistas basados en dónde (es decir, el epítipo) se une el anticuerpo particular a IL-6 y/o cómo afecta a la formación de los posteriores complejos IL-6 y/o multímeros y los efectos biológicos de los mismos. En consecuencia, los diferentes anticuerpo IL-6 de acuerdo con la invención, por ejemplo, pueden ser más adecuados para evitar o tratar afecciones que implican la formación y acumulación de IL-6 soluble sustancial tal como la artritis reumatoide mientras que otros anticuerpos pueden favorecer tratamientos en los que un resultado terapéutico deseado es evitar la formación de IL-6/IL-6R/gp130 o multímeros IL-6/IL-6R/gp130. Esto se puede determinar en ensayos de unión y otros.

35 La actividad anti-IL-6 del anticuerpo anti-IL-6 de la presente invención, y fragmentos del mismo que tienen especificidad de unión para IL-6, también se puede describir por su fuerza de unión o su afinidad para IL-6. Esto puede afectar también a sus propiedades terapéuticas. En una realización de la invención, los anticuerpos anti-IL-6 de la presente invención, y los fragmentos de los mismos que tienen especificidad de unión para IL-6, se unen a IL-6 con una constante de disociación (KD) de menso o igual a 5×10^{-7} , 10^{-7} , 5×10^{-8} , 10^{-8} , 5×10^{-9} , 10^{-9} , 5×10^{-10} , 10^{-10} , 5×10^{-11} , 10^{-11} , 5×10^{-12} , 10^{-12} , 5×10^{-13} , 10^{-13} , 5×10^{-14} , 10^{-14} , 5×10^{-15} o 10^{-15} . Preferentemente, los anticuerpos anti-IL-6 y fragmentos de los mismos se unen a IL-6 con una constante de disociación de menos o igual a 5×10^{-10} .

40 En otra realización de la invención, la actividad anti-IL-6 de los anticuerpos anti-IL-6 de la presente invención y los fragmentos de los mismos que tienen especificidad de unión por IL-6, se unen a IL-6 con una velocidad de disociación de menos de o igual a 10^{-4} S^{-1} , $5 \times 10^{-5} \text{ S}^{-1}$, 10^{-5} S^{-1} , $5 \times 10^{-6} \text{ S}^{-1}$, 10^{-6} S^{-1} , $5 \times 10^{-7} \text{ S}^{-1}$, o 10^{-7} S^{-1} . En una realización de la invención, los anticuerpos anti-IL-6 de la invención y los fragmentos de los mismos que tienen especificidad de unión por IL-6, se unen a un epítipo de IL-6 lineal o conformacional.

50 En una realización adicional de la invención, la actividad anti-IL-6 de los anticuerpos anti-IL-6 de la presente invención y los fragmentos de los mismos que tienen especificidad de unión por IL-6, presentan actividad anti-IL-6 mejorando o reduciendo los síntomas de, o tratar alternativamente o evitar, enfermedades y trastornos asociados con IL-6. Ejemplos no limitantes de enfermedades y trastornos asociados con IL-6 se exponen anteriormente. Como se ha señalado la fatiga relacionada con el cáncer, caquexia y artritis reumatoide son indicaciones preferidas para los anticuerpos IL-6 en cuestión.

55 En otra realización de la invención, los anticuerpos anti-IL-6 descritos en el presente documento, o fragmentos de unión a IL-6 de los mismos, no tienen especificidad de unión para IL-6R o la glucoproteínas transductora de señal gp130.

Aislamiento y exploración de células B

60 Se describen en el presente documento métodos para aislar poblaciones clónicas de células B específicas de antígeno que se pueden utilizar para aislar al menos una célula específica de antígeno. Como se describe y se ejemplifica posteriormente, estos métodos contienen una serie de etapas de cultivo y selección que se pueden utilizar por separado, en combinación, secuencialmente, repetitivamente, o periódicamente. Preferentemente, estos métodos se utilizan para aislar al menos una célula específica de antígeno, que se puede utilizar para producir un anticuerpo monoclonal, que es específica de un antígeno deseado, o una secuencia de ácido nucleico para dicho anticuerpo.

Se describe en el presente documento un método que comprende las etapas de:

- a. preparar una población celular que comprende al menos una célula B específica de antígeno;
- 5 b. enriquecer la población celular, por ejemplo, por cromatografía, para formar una población celular enriquecida que comprende al menos una célula B específica de antígeno;
- c. aislar una célula B única de la población enriquecida de células B; y
- d. determinar si la célula B única produce un anticuerpo específico del antígeno.

10 También se describe una mejoría de un método para aislar una única célula B productora de anticuerpos, comprendiendo la mejoría el enriquecimiento de una población de células B que se obtiene de un huésped que se ha inmunizado o se ha expuesto naturalmente a un antígeno, donde la etapa de enriquecimiento precede cualquiera de las etapas de selección, comprende al menos una etapa de cultivo, y da como resultado una población clónica de células B que producen un único anticuerpo monoclonal específico de dicho antígeno.

15 A lo largo de la presente solicitud, una “población clónica de células B” se refiere a una población de células B que solo secreta un único anticuerpo específico contra un antígeno deseado. Es decir que estas células producen solamente un tipo de anticuerpo monoclonal específico contra el antígeno deseado.

20 En la presente solicitud, “enriquecer” una población celular significa el aumento de la frecuencia de las células deseadas, normalmente células específicas de antígeno, contenidas en una población celular mixta, por ejemplo, un aislado que contienen células B derivado de un huésped que se inmuniza contra un antígeno deseado. Por lo tanto, una población celular enriquecida engloba una población celular que tiene una frecuencia mayor de células específicas de antígeno como resultado de una etapa de enriquecimiento, pero esta población de células puede contener y producir diferentes anticuerpos.

25 La expresión general “población celular” engloba poblaciones celulares pre y post-enriquecimiento, teniendo en mente que cuando se llevan a cabo múltiples etapas de enriquecimiento, una población celular puede ser pre- y post-enriquecimiento. Por ejemplo, se describe en el presente documento un método para:

- 30 a. recolectar una población celular a partir de un huésped inmunizado para obtener una población celular recolectada;
- b. crear al menos una suspensión de células únicas de la población celular recolectada;
- c. enriquecer al menos una suspensión celular única para formar una primera población celular enriquecida;
- 35 d. enriquecer la primera población celular enriquecida para formar una segunda población celular enriquecida;
- e. enriquecer la segunda población celular enriquecida para formar una tercera población celular enriquecida; y
- f. seleccionar un anticuerpo producido por una célula específica de antígeno de la tercera población celular enriquecida.

40 Cada población celular se puede utilizar directamente en la siguiente etapa, o puede congelarse parcial o totalmente durante un almacenamiento a largo o corto plazo o para etapas posteriores. También, se pueden suspender individualmente la población celular para dar lugar a suspensiones celulares únicas. La suspensión celular única se puede enriquecer, de forma que una suspensión celular única funciona como la población celular de pre-enriquecimiento. Luego, una o más suspensiones celulares únicas específicas de antígeno juntas forman la población celular enriquecida; las suspensiones celulares únicas específicas de antígeno se pueden agrupar juntas, por ejemplo, recolocándolas en placas para análisis adicionales y/o producción de anticuerpos.

50 Se describe en el presente documento un método para enriquecer una población celular para dar lugar a una población celular enriquecida que tiene una frecuencia celular específica de antígeno que es aproximadamente del 50 % a aproximadamente el 100 %, o aumentos de los mismos. Preferentemente la población celular enriquecida tiene una frecuencia celular específica de antígeno mayor o igual a aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 %.

55 También se describe un método para enriquecer una población celular por el que la frecuencia de células específicas del antígeno aumenta al menos aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, o aumentos de los mismos.

60 A lo largo de la presente solicitud, el término “aumento” se utiliza para definir un valor numérico en grados variables de precisión, por ejemplo, para el más cercano 10, 1, 0,1, 0,01, etc. El aumento se puede redondear a cualquier grado de precisión medible, y no es necesario redondear el aumento al mismo grado de precisión en ambos lados del intervalo. Por ejemplo, el intervalo 1 a 100 o aumentos del mismo incluye intervalos tales como de 20 a 80, 5 a 50, y 0,4 a 98. Cuando el intervalo tiene extremos abiertos, por ejemplo un intervalo menor de 100, los incrementos del mismo significa aumentos entre 100 y el límite medible. Por ejemplo, menos de 100 o aumentos del mismo significa de 0 a 100 o incrementos de los mismos a menos que la característica, por ejemplo, la temperatura, no se limita a 0.

65 La especificidad de antígeno se puede medir con respecto a cualquier antígeno. El antígeno puede ser cualquier

sustancia al que se puede unir un anticuerpo incluyendo, pero sin limitarse a, péptidos, proteínas o fragmentos de las mismas, carbohidratos, moléculas orgánicas e inorgánicas, receptores producidos por células animales, células bacterianas, y virus; enzima; agonistas y antagonistas de rutas biológicas; hormonas; y citocinas. Los antígenos ejemplares incluyen pero no se limitan a, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, IFN- α , IFN- γ , BAFF, CXCL13, IP-10, VEGF, EPO, EGF, HRG, factor de crecimiento del hepatocito (HGF) y Hepcidina. Los antígenos preferidos incluyen IL-6, IL-13, TNF- α , VEGF- α , Factor de crecimiento del hepatocito (HGF) y Hepcidina. En un método que utiliza más de una etapa de enriquecimiento, el antígeno utilizado en cada etapa de enriquecimiento puede ser el mismo que o diferentes entre ellos. Las múltiples etapas de enriquecimiento con el mismo antígeno pueden producir una población mayor y/o diversa de células específicas de antígeno; las etapas múltiples de enriquecimiento con diferentes antígenos pueden producir una población celular enriquecida con especificidad cruzada contra los diferentes antígenos.

Se puede llevar a cabo el enriquecimiento de la población celular por cualquier medio de selección conocido en la técnica para aislar células específicas de antígeno. Por ejemplo, se puede enriquecer por técnicas cromatográficas, por ejemplo tecnología de perlas Miltenyi y perlas magnéticas. Las perlas se pueden unir directa o indirectamente al antígeno de interés. El método de enriquecimiento de una población puede incluir al menos una etapa de enriquecimiento cromatográfico.

Una población celular también se puede enriquecer llevando a cabo cualquier técnica de ensayo específico de antígeno que se conoce en la técnica, por ejemplo, un ensayo ELISA o un ensayo halo. Los ensayos ELISA incluyen, pero no se limita a, inmovilización selectiva de antígeno (por ejemplo captura de antígeno biotinilado mediante una placa revestida de estreptavidina, avidina o neutravidina), revestimiento de placa con antígeno no específico, y por medio de una estrategia de construcción de antígeno (por ejemplo, captura selectiva de antígeno seguida por unión de la pareja de adición para generar un complejo proteína-antígeno heteromérico). El antígeno se puede fijar directa o indirectamente en una matriz sólida o soporte, por ejemplo, una columna. Un ensayo halo comprende poner en contacto las células con perlas cargadas con el antígeno y anticuerpo anti-huésped marcado específico del huésped que se utiliza para recolectar las células B. El marcador puede ser, por ejemplo, un fluoróforo. Se puede llevar a cabo al menos una etapa de enriquecimiento en al menos una suspensión celular única. El método de enriquecimiento de una población celular puede incluir al menos una etapa de enriquecimiento cromatográfico y al menos una etapa de ensayo de enriquecimiento.

Los métodos de "enriquecimiento" de una población celular por tamaño o densidad se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. 5.627.052. Estas etapas se pueden utilizar en el presente método además del enriquecimiento de la población celular por especificidad antigénica.

Las poblaciones celulares pueden contener al menos una célula capaz de reconocer un antígeno. Las células de reconocimiento de antígenos incluyen, pero no se limitan a, células B, células plasmáticas, y progenie de las mismas. Una población celular clónica puede contener un solo tipo de células B específicas de antígeno, es decir, la población produce un único anticuerpo monoclonal específico para un antígeno deseado.

Se cree que la población específica de antígeno clónica de células B consiste predominantemente en células secretoras de anticuerpos específicas de antígeno, que se obtiene por un nuevo cultivo y un protocolo de selección que se describe en el presente documento. En consecuencia, también se describen métodos para obtener una población celular enriquecida que contiene al menos una célula secretora de anticuerpos, específica de antígeno. Se describe en el presente documento una población celular enriquecida que contienen aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 100 %, o incrementos de las mismas, o más de o igual a aproximadamente un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 100 % de células secretoras de anticuerpos, específicas de antígeno.

También se describe un método para aislar una única célula B por enriquecimiento de una población celular que se obtiene de un huésped antes de cualquiera de las etapas de selección, por ejemplo, la selección de una célula B particular a partir de una población celular y/o seleccionar un anticuerpo producido por una célula particular. La etapa de enriquecimiento se puede llevar a cabo como una, dos, tres, o más etapas. Una célula B única se puede aislar de una población celular enriquecida antes de confirmar si la única célula B secreta un anticuerpo con una especificidad por antígeno o una propiedad deseada.

Se utiliza el método de enriquecimiento de una población celular en un método para la producción y/o selección de anticuerpos. Por lo tanto, se describe un método que comprende el enriquecimiento de una población celular antes de seleccionar un anticuerpo. El método puede incluir las etapas de: preparar una población celular que comprende al menos una célula específica de antígeno, enriquecer la población celular aislando al menos una célula específica de antígeno para formar una población celular enriquecida, e inducir la producción de anticuerpos de al menos una célula específica de antígeno. La población celular enriquecida puede contener más de una célula específica de antígeno. Cada célula específica de antígeno de la población enriquecida se puede cultivar en condiciones que produzcan una población de células B específicas de antígeno clónicas antes de aislar una célula productora de anticuerpo de la misma y/o producir un anticuerpo utilizando dicha célula B o una secuencia de ácido nucleico que se corresponde con dicho anticuerpo. Al contrario que con las técnicas anteriores en las que los anticuerpos se producen de una población celular con una baja frecuencia de células específicas de antígeno, la presente invención

permite la selección de anticuerpos entre una lata frecuencia de células específicas de antígeno. Debido a que la etapa de enriquecimiento se utiliza antes de la selección de anticuerpo, la mayoría de las células, preferentemente casi todas las células, que se utilizan para la producción de anticuerpos son específicas del antígeno. Produciendo anticuerpos de una población de células con un aumento de frecuencia de especificidad antigénica, aumenta la cantidad y variedad de anticuerpos.

En los métodos de selección de anticuerpos descritos, se selecciona un anticuerpo preferentemente después de una etapa de enriquecimiento y una etapa de cultivo que da como resultado una población clónica de células B específicas de antígeno. Los métodos pueden comprender además una etapa de secuenciación de un anticuerpo seleccionado o partes del mismo a partir de una o más células específicas de antígeno aisladas. Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para la secuenciación y puede incluir la secuenciación de la cadena pesada, cadena ligera, región(es) variable(s), y/o región(es) determinante(s) de complementariedad (CDR).

Además de la etapa de enriquecimiento, el método para la selección de anticuerpo también puede incluir una o más etapas de exploración de la población celular en cuanto a reconocimiento del antígeno y/o funcionalidad de anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos deseados pueden tener características estructurales específicas, tales como de unión a un epítipo particular o imitación de una estructura particular; actividad antagonista o agonista; o actividad neutralizante, por ejemplo, inhibición de la unión entre el antígeno y un ligando. La exploración de la funcionalidad del anticuerpo puede ser dependiente del ligando. La exploración de la funcionalidad del anticuerpo incluye, pero no se limita a, un ensayo de interacción proteína-proteína que recree la interacción natural del ligando del antígeno con el receptor proteico recombinante; y una respuesta basada en células que es dependiente de ligando y se compruebe fácilmente (por ejemplo, respuesta de proliferación) El método para la selección de anticuerpos puede incluir una etapa de exploración de la población celular respecto a la funcionalidad del anticuerpo midiendo la concentración inhibidora (CI50). Al menos una de las células específica de antígeno aisladas puede producir un anticuerpo que tenga una CI50 de menos de aproximadamente 100, 50, 30, 25, 10 µg/ml, o aumentos de los mismos.

Además de la etapa de enriquecimiento, el método para la selección de anticuerpos puede incluir también una o más etapas de exploración de una población celular respecto a la fuerza de unión. La fuerza de unión del anticuerpo se puede medir por cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo, Biacore). Al menos una de las células específicas de antígeno aisladas pueden producir un anticuerpo que tenga una alta afinidad por el antígeno, por ejemplo con una constante de disociación (Kd) de menos de aproximadamente 5×10^{-10} M⁻¹, preferentemente aproximadamente 1×10^{-13} a 5×10^{-10} , 1×10^{-12} a 1×10^{-10} , 1×10^{-12} a $7,5 \times 10^{-11}$, 1×10^{-11} a 2×10^{-11} , aproximadamente $1,5 \times 10^{-11}$ o menos, o aumentos de los mismos. Se dice que los anticuerpos son maduros en afinidad. La afinidad de los anticuerpos puede ser comparable a o mayores que la afinidad de uno cualquiera de Panorex® (edrecolomab), Rituxan® (rituximab), Herceptin® (trastuzumab), Mylotarg® (gentuzumab), Campath® (alemtuzumab), Zevalin™ (ibritumomab), Erbitux™ (cetuximab), Avastin™ (bevacizumab), Raptiva™ (efalizumab), Remicade® (infliximab), Humira™ (adalimumab), y Xolair™ (omalizumab). Preferentemente, la afinidad de los anticuerpos es comparable o mayor que la afinidad de Humira™. La afinidad de un anticuerpo puede estar también aumentada por técnicas de maduración de la afinidad conocidas. Al menos una población celular se puede explorar respecto a al menos una, preferentemente ambas, de la funcionalidad del anticuerpo y la fuerza de unión del anticuerpo.

Además de la etapa de enriquecimiento, el método para la selección de anticuerpos también puede incluir una o más etapas de exploración de la población celular respecto a homología de secuencia de anticuerpo, especialmente la homología humana. Al menos una de las células específicas de antígeno aisladas puede producir un anticuerpo que tenga una homología con un anticuerpo humano de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 100 % o aumentos de la misma, o mayor de aproximadamente un 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 95 % de homología. Los anticuerpos pueden estar humanizados para aumentar la homología con una secuencia humana por técnicas conocidas en la técnica tal como injerto de CDR o injerto de resto determinante de selectividad (SDR).

Se describen en el presente documento los propios anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones descritas anteriormente en términos de CI50, Kd y/u homología.

El protocolo de selección de células B que se desvela en el presente documento tiene varias ventajas intrínsecas frente a otros métodos para obtener células B secretoras de anticuerpo y anticuerpos monoclonales específicos contra antígenos diana deseados. Estas ventajas incluyen, pero no se restringen a las siguientes:

Primero, se ha descubierto que cuando estos procedimientos se seleccionan se utilizan con un antígeno deseado tal como IL-6 o TNF- α , los métodos resultan reproduciblemente en células B específicas de antígeno capaces de generar lo que parecen ser un amplio complemento de anticuerpos, es decir, anticuerpos que se unen a varios epítopos diferentes del antígeno. Si estar ligados a teoría alguna, se ha hecho la hipótesis de que el amplio complemento se atribuye a la etapa de enriquecimiento de antígeno antes de la recuperación inicial de células B. Además, esta ventaja permite el aislamiento y selección de anticuerpos con propiedades diferentes ya que estas propiedades varían dependiendo de la especificidad epitópica del anticuerpo particular.

Segundo, se ha descubierto que el protocolo de selección de células B produce de manera reproducible un cultivo de células B clónicas que contienen una única célula B, o su progenie, que secreta un único anticuerpo monoclonal que generalmente se une al antígeno deseado con una afinidad de unión relativamente alta, es decir, afinidades de unión antigénica picomolares o mejores. Por el contrario, los métodos de selección de anticuerpos anteriores tendían a producir anticuerpos con una afinidad relativamente poco alta y por lo tanto eran necesarios procedimientos de exploración extensos para aislar un anticuerpo con potencial terapéutico. Sin quedar ligados por teoría alguna, se ha hecho la hipótesis de que los resultados del protocolo de inmunización con células B in vivo del huésped (inmunización primaria) seguida por una segunda estimulación con células B in vitro (etapa de sensibilización con antígeno secundaria) puede aumentar la capacidad y propensión de las células B clónicas recuperadas para secretar un único anticuerpo monoclonal con alta afinidad específico del antígeno diana.

Tercero, se ha observado (como se muestra en el presente documento con las células B específicas de IL-6) que el protocolo de selección de células B produce de manera reproducible células B enriquecidas que producen IgG que son, de media, altamente selectivas (específicas de antígeno) contra el antígeno deseado. Se cree que las células B enriquecidas de antígeno que se recuperan por estos métodos contienen células B capaces de dar como resultado el complemento completo deseado de especificidades epitópicas como se ha tratado anteriormente.

Cuarto, se ha observado que los protocolos de selección de células B, incluso cuando se utilizan con antígenos pequeños, es decir, péptidos de 100 aminoácidos o menos, por ejemplo, de 5-50 aminoácidos, dan lugar de una manera reproducible a un cultivo de células B clónicas que secreta un único anticuerpo de alta afinidad por el antígeno pequeño, por ejemplo, un péptido. Esto es muy sorprendente ya que generalmente es bastante difícil, da mucho trabajo, y a veces ni incluso fiable producir anticuerpos de alta afinidad contra péptidos pequeños. En consecuencia, la invención se puede utilizar para producir anticuerpos terapéuticos contra péptidos diana deseados, por ejemplo, víricos, bacterianos, o péptidos autoantigénicos, por lo que se permite la producción de anticuerpos monoclonales con propiedades de unión muy distintas o incluso la producción de un cóctel de anticuerpos monoclonales para contra diferentes péptidos diana, por ejemplo, diferentes cepas víricas. Esta ventaja puede ser útil especialmente en el contexto de la producción de una vacuna terapéutica o profiláctica que tenga las valencias deseadas, tal como una vacuna de HPV que induzca una inmunidad protectora contra diferentes cepas de HPV.

Quinto, el protocolo de selección de células B, particularmente cuando se utilizan con células B derivadas de conejos, tiene a producir de manera reproducible secuencias de anticuerpo específicas de antígeno que son muy similares a las inmunoglobulinas humanas endógenas (alrededor de un 90 % similares a nivel de aminoácidos) y que contienen unas CDR que poseen una longitud muy análoga a las inmunoglobulinas humanas y por lo tanto no necesitan modificaciones en la secuencia o muy pocas (típicamente como mucho se pueden modificar unos pocos restos de CDR en la secuencia de anticuerpo parental y no se introducen restos exógenos en la región marco conservada) con el fin de eliminar potenciales problemas de inmunogenicidad. En particular, el anticuerpo recombinante preferentemente contendrá solo los restos de CDR1 y CRD2 del huésped (conejo) necesarios para el reconocimiento del antígeno y la CDR3 completa. Por lo que la alta afinidad de unión al antígeno de las secuencias de anticuerpo recuperadas producidas de acuerdo con el protocolo de selección de células B y anticuerpos se mantenga intacta o sustancialmente intacta incluso con la humanización.

En suma, estos métodos se pueden utilizar para producir anticuerpos que presentan afinidades de unión más altas contra más epítopos distintos mediante el uso de un protocolo más eficaz que el que se conocía anteriormente.

Se describe en el presente documento un método para identificar una única célula B que secreta un anticuerpo específico contra un antígeno deseado y que posee opcionalmente al menos una propiedad funcional deseada tal como, afinidad, avidez, actividad citolítica, y similares por un proceso que incluye las siguientes etapas:

- a. inmunizar un huésped contra un antígeno;
- b. recolectar las células B del huésped;
- c. enriquecer las células B recolectadas para aumentar la frecuencia de células específicas de antígeno;
- d. creación de al menos una suspensión celular;
- e. cultivar una sub-población de la suspensión de células únicas en condiciones que favorezcan la supervivencia de una única células B específica de antígeno por pocillo de cultivo;
- f. aislar las células B de la sub-población; y
- g. determinar si la célula B única produce un anticuerpo específico contra el antígeno.

Normalmente, estos métodos comprenderán además una etapa adicional de aislamiento y secuenciación, en todo o en parte, de las secuencias de polipéptido y ácido nucleico que codifican el anticuerpo deseado. Estas secuencias o versiones modificadas o partes de las mismas se pueden expresar en células huésped deseadas con el fin de producir anticuerpos recombinantes contra un antígeno deseado.

Como se ha señalado anteriormente, se cree que la población clónica de células B comprende predominantemente células B secretoras de anticuerpo que producen anticuerpos contra el antígeno deseado. También se cree basándose en los resultados experimentales obtenidos con varios antígenos y con diferentes poblaciones de células B, que las células B producidas clónicamente y las células específicas de antígeno aisladas derivadas de ellas que

se producen de acuerdo con la invención secretan un anticuerpo monoclonal que normalmente tiene una afinidad relativamente alta y además son capaces de producir eficazmente y de manera reproducible una selección de anticuerpos monoclonales con mayor variabilidad epitópica en comparación con otros métodos de derivación de anticuerpos monoclonales a partir de células B específicas de antígeno cultivadas. En una realización ejemplar la población de células inmunitarias que se utilizan en dichos métodos de selección de células B se derivará de un conejo. Sin embargo, se pueden utilizar alternativamente otros huéspedes que produzcan anticuerpos, incluyendo huéspedes no humanos y humanos, como fuente de células B inmunitarias. Se cree que el uso de conejos como fuente de células B puede aumentar la diversidad de anticuerpos monoclonales que se pueden derivar por los métodos. También, las secuencias de anticuerpo derivadas de conejos de acuerdo con la invención normalmente poseen secuencias que tienen un alto grado de identidad de secuencia con las secuencias de anticuerpo humanas haciéndolas favorables para su uso en seres humanos ya que deberían poseer poca antigenicidad. En el curso de la humanización, el anticuerpo final humanizado contiene un contenido de restos de huésped ajenos mucho menores, habitualmente restringidos en un subgrupo de los restos CDR del huésped que se diferencian drásticamente debido a su naturaleza frente a la secuencia diana humana que se utiliza en el injerto. Esto aumenta la probabilidad de recuperación completa de la actividad en el anticuerpo proteico humanizado.

Los métodos de selección de anticuerpos que utilizan una etapa de enriquecimiento desvelados en el presente documento incluyen una etapa de obtención de una población celular que contiene células inmunitarias de un huésped inmunizado. Los métodos para obtener una población celular que contiene células inmunitarias de un huésped inmunizado se conocen en la técnica e incluyen en general la inducción de una respuesta inmunitaria en un huésped y recolectar células del huésped para obtener una o más poblaciones celulares. La respuesta se puede producir inmunizando al huésped contra un antígeno deseado. De manera alternativa, el huésped utilizado como fuente de dichas células inmunitarias se pueden exponer naturalmente al antígeno deseado tal como un individuo que se ha infectado con un agente patógeno particular, tal como una bacteria o virus o alternativamente ha montado una respuesta de anticuerpos específicos contra un cáncer que padece el individuo.

Los animales huéspedes se conocen bien en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, cobayas, conejos, ratones, ratas, primates no humanos, seres humanos, así como otros mamíferos y roedores, pollos, vacas, cerdos, cabras y ovejas. Preferentemente, el huésped es un mamífero, más preferentemente, conejo, ratón, rata, o seres humanos. Cuando se exponen a un antígeno, el huésped produce anticuerpos como parte de la respuesta inmunitaria contra el antígeno. Como se ha mencionado, la respuesta inmunitaria se puede producir naturalmente, como resultado de una enfermedad, o puede inducirse por inmunización con el antígeno. La inmunización se puede llevar a cabo por cualquier método conocido en la técnica, tal como, por una o más inyecciones del antígeno con o sin un agente que aumente la respuesta inmunitaria, tal como el adyuvante completo o incompleto de Freund. También se describe la inmunización intraesplénica. Como una alternativa a la inmunización de un animal huésped in vivo, el método puede comprender la inmunización de una célula huésped cultivada in vitro.

Tras permitir el tiempo para la respuesta inmunitaria (por ejemplo, según se mide por la detección de anticuerpos en el suero), las células del animal huésped se recolectaron para obtener una o más poblaciones celulares. En una realización preferida, una población celular recolectada se explora con respecto a la fuerza de unión de anticuerpos y/o funcionalidad de anticuerpos. Una población celular recolectada es preferentemente a partir de al menos una del bazo, ganglios linfáticos y PBMC se prefieren para la IL-6; y se prefieren los ganglios linfáticos para el TNF. La población celular se recolecta aproximadamente de 20 a aproximadamente 90 días o incrementos de las mismas tras la inmunización, preferentemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 60 días. Una población celular recolectada y/o una suspensión de células únicas de la misma se pueden enriquecer, explorar, y/o cultivar para la selección de anticuerpos. La frecuencia de las células específicas de antígeno en una población celular recolectada es habitualmente de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 %, o aumentos de los mismos.

Una suspensión celular única de una población celular recolectada se puede enriquecer, preferentemente utilizando perlas Miltenyi. A partir de la población celular recolectada que tiene una frecuencia de células específicas de antígeno de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 %, se deriva por tanto una población celular enriquecida que tiene una frecuencia de células específicas de antígeno de aproximadamente el 100 %.

El método de la selección de anticuerpos que utiliza una etapa de enriquecimiento incluye una etapa de producción de anticuerpos a partir de al menos una célula específica de antígeno de una población celular enriquecida. Los métodos de producción de anticuerpos in vitro se conocen bien en la técnica, y se puede emplear cualquier método adecuado. Una población celular enriquecida, tal como una suspensión celular única específica de antígeno de una población celular recolectada, se puede colocar en placas a distintas densidades celulares, tales como 50, 100, 250, 500 u otros aumentos entre 1 y 1000 células por pocillo. Preferentemente, la sub-población comprende no más de aproximadamente 10.000 células secretoras de anticuerpo específicas de antígeno, o aumentos de estos, más preferentemente de aproximadamente 50-10.000, aproximadamente 50-5.000, aproximadamente 50-1.000, aproximadamente 50-500, aproximadamente 50-250 células secretoras de anticuerpo específicas de antígeno, o aumentos de los mismos. Luego se cultivan estas sub-poblaciones en un medio adecuado (por ejemplo, un medio acondicionado para células T activadas, particularmente un 1-5 % de medio acondicionado para células T activadas de conejo) sobre una capa alimentadora, preferentemente en condiciones que favorezcan la supervivencia de una célula secretora de anticuerpos única proliferante por pocillo de cultivo. La capa alimentadora, que comprende en

general un material celular irradiado, por ejemplo células EL4B, no constituye una parte de la población celular. Las células se cultivan en un medio adecuado durante el tiempo suficiente para la producción de anticuerpos, por ejemplo aproximadamente 1 día a aproximadamente 2 semanas., aproximadamente 1 día a aproximadamente 10 días, al menos aproximadamente 3 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 5 días a aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 7 días, u otros aumentos de estos. Se pueden cultivar más de una sub-población simultáneamente. Preferentemente, sobrevive una única células productora de anticuerpo y la progenie de la misma en cada pocillo, proporcionando de esta manera una población clónica de células B específicas de antígeno en cada pocillo. En esta estadio, la inmunoglobulina G (IgG) producida por la población clónica se correlaciona altamente con la especificidad de antígeno. Las IgG pueden presentar una correlación con especificidad de antígeno que es mayor de aproximadamente un 50 %, más preferentemente mayor del 70 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o aumentos de los mismos. Véase le Fig. 3, que representa una correlación ejemplar para IL-6. Las correlaciones se demostraron poniendo los cultivos de células B en condiciones limitantes para establecer un único producto de anticuerpo específico de antígeno por cultivo. Se comparó la síntesis de IgG específica de antígeno frente a la general. Se observaron tres poblaciones: IgG que reconocía un único formato de antígeno (biotinilado y revestimiento directo), IgG detectable y reconocimiento del antígeno independientemente de inmovilización, y producción de IgG sola. La producción de IgG se correlacionaba altamente con la especificidad de antígeno.

Se recolectó opcionalmente un sobrenadante que contenía los anticuerpos, que se podía enriquecer, explorar y/o cultivar respecto a la selección de anticuerpos de acuerdo con las etapas descritas anteriormente. El sobrenadante se puede enriquecer (preferentemente por el ensayo de especificidad de antígeno, especialmente un ensayo ELISSA) y/o explorar en cuanto a la funcionalidad del anticuerpo.

La población de células B específicas de antígeno enriquecida, preferentemente clónica de la que opcionalmente se explora el sobrenadante que se ha descrito anteriormente con el fin de detectar la presencia del anticuerpo monoclonal secretado deseado se utiliza para el aislamiento de unas pocas células B, preferentemente una única célula B, la cual se ensaya entonces en un ensayo apropiado con el fin de confirmar la presencia de una única célula B productora de anticuerpos en la población clónica de células B. Aproximadamente se pueden aislar de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 células de la población clónica de células B, preferentemente menos de aproximadamente 15, 12, 10, 5, o 3 células o aumentos de estas, más preferentemente una única células. La exploración se efectúa preferentemente por un ensayo de especificidad de antígeno, especialmente un ensayo halo. El ensayo halo se puede llevar a cabo con la proteína de longitud completa, o un fragmento de la misma. El sobrenadante que contiene el anticuerpo también se puede explorar respecto al menos uno de: afinidad de unión al antígeno; agonismo o antagonismo de la unión antígeno-ligando, inducción o inhibición de un tipo celular diana específico; inducción o inhibición de lisis de una células diana, e inducción o inhibición de una ruta biológica que implica al antígeno.

La célula específica de antígeno identificada se puede utilizar para derivar las secuencias de ácido nucleico correspondientes que codifican el anticuerpo monoclonal deseado. (Una digestión con AluI puede confirmar que solo se produce un tipo único de anticuerpo monoclonal por pocillo). Como se ha mencionado anteriormente, estas secuencias se pueden mutar, tal como por humanización, con el fin de hacerlas adecuadas para su uso en medicamentos humano.

Como se ha mencionado, la población de células que se utiliza en el proceso también se puede enriquecer, explorar y/o cultivar adicionalmente respecto a selección de anticuerpos de acuerdo con las etapas que se han descrito anteriormente que se pueden repetir o llevar a cabo en un orden diferente. Se puede aislar, cultivar y utilizar para la selección de anticuerpos al menos una célula de una población celular enriquecida, preferentemente clónica, específica de antígeno.

Por lo tanto, se describe un método que comprende:

- a. recolectar una población celular a partir de un huésped inmunizado para obtener una población celular recolectada;
- b. crear al menos una única suspensión celular de la población celular recolectada;
- c. enriquecer al menos una única suspensión celular, preferentemente por cromatografía, para formar una primera población celular enriquecida;
- d. enriquecer la primera población celular enriquecida, preferentemente por un ensayo ELISA, para formar una segunda población celular enriquecida que preferentemente es clónica, es decir, contiene solamente un único tipo de células B específicas de antígeno;
- e. enriquecer la segunda población celular enriquecida, preferentemente por un ensayo halo, para formar una tercera población enriquecida que contiene una única o unas pocas células B que producen un anticuerpo específico contra un antígeno deseado; y
- f. seleccionar un anticuerpo producidos por una célula específica de antígeno aislada de entre la tercera población celular enriquecida.

El método puede incluir adicionalmente una o más etapas de exploración de la población celular recolectada en cuanto a la fuerza de unión del anticuerpo (afinidad, avidéz) y/o funcionalidad del anticuerpo. Las exploraciones

adecuadas incluyen, pero no se limitan a, métodos de ensayo que detectan: si el anticuerpo producido por la célula B específica de antígeno identificada produce un anticuerpo que posee una afinidad de unión al antígeno mínima, si el anticuerpo agoniza o antagoniza la unión de un antígeno deseado a un ligando; si el anticuerpo induce o inhibe la proliferación de un tipo celular específico; si el anticuerpo induce o da lugar a una reacción citolítica contra células diana; si el anticuerpo se une a un epítipo específico, y si el anticuerpo modula (inhibe o antagoniza) una ruta o rutas biológicas que implican el antígeno.

De manera similar, el método puede incluir una o más etapas de exploración de la segunda población celular enriquecida respecto a la fuerza de unión del anticuerpo y/o funcionalidad del anticuerpo.

El método puede incluir adicionalmente una etapa de secuenciación de la secuencia de polipéptido o la secuencia de ácido nucleico correspondiente del anticuerpo seleccionado. El método puede incluir también una etapa de producción de un anticuerpo recombinante que utiliza la secuencia, un fragmento del mismo, o una versión modificada genéticamente del anticuerpo seleccionado. Los métodos para mutar las secuencias de anticuerpo con el fin de que mantenga las propiedades deseadas se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen humanización, quimerización, producción de anticuerpo de cadena sencilla; estos métodos de mutación pueden dar lugar a anticuerpos recombinantes que posean la función efectora deseada, inmunogenicidad, estabilidad, eliminación o adición de glucosilación, y similares. El anticuerpo recombinante se puede producir por cualquier célula recombinante adecuada, que incluye, pero no se limita a células de mamífero tales como CHO, COS, BHK, HEK-293, células bacterianas, células de levadura, células vegetales, células de insecto, y células de anfibio. Los anticuerpos se pueden expresar en células de levadura poliploides, es decir, células de levadura diploides, particularmente de *Pichia*.

El método puede comprender:

- a. inmunizar un huésped contra un antígeno para producir anticuerpos del huésped;
- b. explorar los anticuerpos del huésped respecto a la especificidad antigénica y neutralización;
- c. recolectar las células B del huésped;
- d. enriquecer las células B recolectadas para crear una población celular enriquecida que tenga un aumento de la frecuencia de células específicas de antígeno;
- e. cultivar una o más sub-poblaciones de entre la población celular enriquecidas en condiciones que favorezcan la supervivencia de una única célula B para producir una población clónica en al menos un pocillo de cultivo;
- f. determinar si la población clónica produce un anticuerpo específico contra el antígeno;
- g. aislar una única célula B; y
- h. secuencias la secuencia de ácido nucleico del anticuerpo producido por la única célula B.

Métodos para humanizar anticuerpos

Se describe en el presente documento un método para humanizar cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo. Se lleva a cabo el siguiente método para la humanización de las cadenas pesadas y ligeras:

Cadena ligera

1. Identificar el aminoácido que es el primero a continuación de la secuencia del péptido de señal. Este es el inicio de la región marco conservada 1. El péptido de señal comienza en la primera metionina de inicio y normalmente tiene, pero no necesariamente, 22 aminoácidos de longitud en las secuencias proteicas de cadena ligera de conejo. El inicio del polipéptido maduro se puede determinar también experimentalmente por secuenciación del extremo N de la proteína, o se puede predecir utilizando un algoritmo de predicción. Esto es también el inicio de la región marco conservada 1 como se ha definido clásicamente por los expertos en el campo.

Ejemplo: el resto 1 de aminoácido RbtVL en la Figura 2, que comienza por 'AYDM...'

2. Identificar el final de la región marco conservada 3. Este tiene normalmente 86-90 aminoácidos a continuación del inicio de la región marco conservada y normalmente es un resto de cisteína precedido por dos restos de tirosina. Este es el final de la región marco conservada 3 como se define clásicamente por los expertos en el campo.

Ejemplo: El resto de aminoácido 88 de RbtVL en la Figura 2, que termina como 'TYYC'

3. Uso de la secuencia de cadena ligera de conejo del polipéptido que comienza desde el principio de la región marco conservada 1 hasta el final de la región marco conservada 3, como se ha definido anteriormente y llevar a cabo la búsqueda de la homología de secuencia respecto a las secuencias proteicas de anticuerpos humanos más similares. Esto normalmente será una búsqueda con respecto a las secuencias de la línea germinal humana antes de la maduración del anticuerpo con el fin de reducir la inmunogenicidad, sin embargo, se pueden utilizar cualquier secuencia humana. Normalmente, se puede utilizar un programa como BLAST para buscar una base de datos de secuencias para el más homólogo. Las bases de datos de las secuencias de anticuerpo humano se pueden encontrar en distintas fuentes tales como NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica).

Ejemplo: secuencia de aminoácidos RbtVL de los restos numerados de 1 a 88 en la Figura 2 se procesan con BLAST respecto a la base de datos de anticuerpos de la línea germinal humana. Las tres secuencias superiores

únicas de respuesta se muestran en la Figura 2 como L12A, V1 y Vx02.

4. En general la mayoría de las secuencias variables de cadena ligera de la línea germinal humana más homólogas se utilizan entonces como la base para la humanización. Sin embargo los expertos en la técnica pueden decidir utilizar otra secuencia que no sea la de más alta homología que se determina por el algoritmo de homología, basándose en otros factores que incluyen los huecos de secuencia y las similitudes de las regiones marco conservadas.

Ejemplo: En la Figura 2, L12A era la secuencia de cadena ligera variable de la línea germinal humana más homóloga y se utiliza como la base para la humanización de RbtVL.

5. Determinar la disposición de las regiones marco conservadas y CDR (FR1, FR2, FR3, CDR1 y CDR2) para el homólogo humano que se va a utilizar para la humanización de la cadena ligera. Esto es utilizando la disposición tradicional como se describe en el campo. Alinear la secuencia variable de cadena ligera de conejo con la homóloga humana, mientras se mantienen la disposición de la región marco conservada y las regiones CDR.

Ejemplo: En la figura 2, la secuencia RbtVL se alinea con la secuencia homóloga humana L12A, y se indican la región marco conservada y los dominios CDR.

6. Se sustituyen las regiones CDR1 y CDR2 de la secuencia homóloga de cadena ligera humana con las secuencias CDR1 y CRD2 de la secuencia de conejo. Si existen diferencias de longitud entre las secuencias de CDR humanas y de conejo entonces se utilizan las secuencias CDR de conejo completas y sus longitudes. Puede ser posible que la especificidad, afinidad y/o inmunogenicidad del anticuerpo humanizado resultante no esté alterado si se lleva a cabo intercambios más pequeños o más grandes en la secuencia, o si se altera un resto específico, sin embargo aunque los intercambios que se han descrito se han utilizado satisfactoriamente, no se excluye la posibilidad de que se puedan permitir otros cambios.

Ejemplo: En la Figura 2, los restos de aminoácidos de CDR1 y CDR2 de la región variable de cadena ligera homóloga humana L12A se sustituyen con las secuencias de aminoácidos de CDR1 y CDR2 de la secuencia de cadena ligera del anticuerpo de conejo RbtVL. Las regiones marco conservadas humanas 1, 2 y 3 de L12A no se alteran. La secuencia humanizada resultante se muestra debajo como VLh partir de los restos numerados de 1 a 88. Nótese que los únicos restos que son diferentes de la secuencia humana L12A están subrayados, y por lo tanto son restos de aminoácidos derivados de conejo. En este ejemplo, solamente 8 de los 88 restos son diferentes que en la secuencia humana.

7. Después de la región marco conservada de la nueva secuencia híbrida creada en la etapa 6, se adhiere la secuencia CDR3 completa de cadena ligera del anticuerpo de conejo. La secuencia CDR3 puede ser de distintas longitudes pero normalmente tiene 9 a 15 aminoácidos de longitud. La secuencia de CDR3 y el inicio de la siguiente región marco conservada 4 se ha definido clásicamente y es identificable por los expertos en la técnica. Normalmente, el inicio de la región marco conservada, y por lo tanto tras el final de la CDR3, consiste en la secuencia 'FGGG...', sin embargo puede existir alguna variación en estos restos.

Ejemplo: En la Figura 2, la CDR3 de RbtVL (los restos de aminoácidos numerados de 89-100) se añade tras el final de la región marco conservada 3 en la secuencia humanizada indicada como VLh.

8. La región marco conservada 4 de cadena ligera de conejo, que normalmente es el final de 11 restos de aminoácidos de la región variable de cadena ligera y que comienza como se indica en la etapa 7 anterior y normalmente finaliza con la secuencia de aminoácidos '...VVKR' se sustituye con la región marco conservada 4 homóloga más cercana de cadena ligera humana, habitualmente de la línea germinal. Frecuentemente esta región marco conservada 4 de cadena ligera humana tiene la secuencia 'FGGGTKVEIKR'. Es posible que se utilicen otras secuencias de región marco conservada 4 de cadena ligera humana que no sean las más homólogas o diferentes de otra manera sin que afecten la especificidad, afinidad y/o inmunogenicidad del anticuerpo humanizado resultante. Esta secuencia de región marco conservada 4 de cadena ligera humana se añade al final de la secuencia variable de la cadena ligera humanizada inmediatamente a continuación de la secuencia de CDR3 de la etapa 7 anterior. Este es ahora el final de la secuencia de aminoácidos variable de cadena ligera humanizada.

Ejemplo: En la Figura 2, la región marco conservada 4 (FR4) de la secuencia de cadena ligera de conejo RbtVL se muestra por encima de una secuencia FR4 humana homóloga. La secuencia FR4 humana se añade a la secuencia variable de cadena ligera humanizada (VLh) justo después del final de la región CDR3 añadida en la etapa 7 anterior.

Cadena pesada

1. Identificar el aminoácido que es el primero a continuación de la secuencia del péptido de señal. Este es el comienzo de la región marco conservada 1. El péptido de señal comienza en la primera metionina de inicio y tiene normalmente 19 aminoácidos de longitud en las secuencias proteicas de cadena pesada del conejo. Normalmente, pero no siempre necesariamente, los 3 restos de aminoácidos finales de un péptido de señal de cadena pesada de conejo son '...VQC', seguidos por el inicio de la región marco conservada 1. El inicio del polipéptido maduro también se puede determinar experimentalmente por secuenciación del extremo N de la proteína, o se puede predecir utilizando un algoritmo de predicción. Es decir también, el inicio de la región marco conservada 1 como se ha definido clásicamente por los expertos en el campo.

Ejemplo: Resto 1 de aminoácido de dRbtVH en la Figura 2, que comienza con 'QEQL...'

2. Identificar el final de la región marco conservada 3. Esta tiene normalmente 95-100 aminoácidos a continuación del inicio de la región marco conservada 1 y normalmente tiene la secuencia final de 'CAR...' (aunque la alanina puede ser también valina). Este es el final de la región marco conservada 3 como se ha

definido clásicamente por los expertos en el campo.

Ejemplo: resto de aminoácido 98 de RbtVH en la Figura 2, que termina como '...FCVR'.

3. Utilizar la secuencia del polipéptido de cadena pesada del conejo que comienza desde el principio de la región marco conservada 1 al final de la región marco conservada 3 como se ha definido anteriormente y llevar a cabo una búsqueda de homología de secuencia respecto a las secuencias proteicas de anticuerpo humano más similares. Esto será normalmente en una base de datos de secuencias de la línea germinal humana antes de la maduración del anticuerpo con el fin de reducir la posibilidad de inmunogenicidad, sin embargo se pueden utilizar cualquiera de las secuencias humanas. Normalmente se puede utilizar un programa como el BLAST para buscar en una base de datos de secuencias la más homóloga. Las bases de datos de secuencias de anticuerpo humanas se pueden encontrar entre distintas fuentes tales como el NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica).

Ejemplo: Secuencias de aminoácidos de RbtVH desde los restos numerados de 1 hasta 98 en la Figura 2 se procesan por BLAST contra la base de datos de anticuerpos de la línea germinal humana. Las tres secuencias únicas superiores de respuesta se muestran en la Figura 2 como 3-64-04,3-66-04 y 3-53-02.

4. En general la secuencia variable de cadena pesada más homóloga de la línea germinal humana se utiliza entonces como base para la humanización. Sin embargo, los expertos en la técnica pueden decidir si utilizan otra secuencia que no sea la más homóloga según determina el algoritmo de homología, basándose en otros factores que incluyen los huecos de secuencia y las similitudes de regiones marco conservadas.

Ejemplo 4: 3-64-04 en la Figura 2 era la secuencia variable de cadena pesada más homóloga de la línea germinal humana y se utilizó como base para la humanización de RbtVH.

5. Determinar la disposición de las regiones marco conservadas y CDR (FR1, FR2, FR3, CDR1 y CDR2) de la homóloga humana que se va a utilizar para la humanización de la cadena pesada. Esto es utilizando la disposición que se describe en el campo. Alinear la secuencia variable de cadena pesada del conejo con la homóloga humana, mientras que se mantiene la disposición de las regiones marco conservadas y CDR.

Ejemplo: En la figura 2, la secuencia de RbtVH se alinea con la secuencia homóloga humana 3-64-04, y se indican la región marco conservada y dominios CDR.

6. Sustituir las regiones CDR1 y CDR2 de la secuencia de cadena pesada homóloga humana con las secuencias CDR1 y CDR2 de la secuencia de conejo. Si existen diferencias de longitud entre las secuencias CDR humanas y de conejo entonces se utilizan las secuencias CDR de conejo completas y sus longitudes. Además, puede ser necesario sustituir los tres aminoácidos finales de la región marco conservada 1 de cadena pesada humana con los tres aminoácidos finales de la región marco conservada 1 de la cadena pesada de conejo. Normalmente, pero no siempre, en la región marco conservada de cadena pesada del conejo estos tres restos están a continuación de un resto de glicina precedido por un resto de serina. Además, puede ser necesario sustituir el aminoácido final de la región marco conservada 2 de la cadena pesada humana con el aminoácido final de la región marco conservada 2 de la cadena pesada del conejo. Típicamente, pero no necesariamente siempre, este es un resto de glicina precedido por un resto de isoleucina en la región marco conservada de cadena pesada del conejo. Es posible que la especificidad, afinidad y/o inmunogenicidad del anticuerpo humanizado resultante puedan no alterarse si se lleva a cabo intercambios de secuencia mayores o menores, o si se altera un resto(s) específico(s), aunque los intercambios que se describen se han utilizado satisfactoriamente, no se excluye la posibilidad de que se puedan permitir otros cambios. Por ejemplo, normalmente existe un resto de aminoácido triptófano cuatro restos antes del final de la región CDR2 de cadena pesada del conejo, mientras que en la CDR2 de cadena pesada humana este resto es normalmente un resto de Serina. El cambio de este resto de triptófano del conejo por un resto de serina humano en esta posición ha demostrado que tienen un mínimo efecto o ninguno en la especificidad o afinidad del anticuerpo humanizado, y por lo tanto minimiza adicionalmente el contenido de restos de aminoácidos derivados de la secuencia de conejo en la secuencia humanizada.

Ejemplo: En la Figura 2, los restos de aminoácidos de CDR1 y CDR2 de la región variable de cadena pesada homóloga humana se sustituyen con las secuencias de aminoácidos de CDR1 y CDR2 de la secuencia de cadena ligera de anticuerpo RbtVH de conejo, excepto en el resto encuadrado, que es un triptófano en la secuencia de conejo (posición número 63) y serina en la misma posición de la secuencia humana, y se mantiene como el resto de serina humano. Además de los cambios de CDR1 y CDR2, los últimos tres aminoácidos de la región marco conservada 1 (posiciones 28-30) así como el resto final de la región marco conservada 2 (posición 49) se mantienen como los restos de aminoácidos del conejo en vez de los humanos. La secuencia humanizada resultante se muestra abajo como VHH desde los restos numerados desde 1 hasta 98. Nótese que los únicos restos que son diferentes de la secuencias 3-64-04 humanas están subrayados, y por lo tanto son restos de aminoácido derivados de conejo. En este ejemplo solamente 15 de los 98 restos son diferentes de la secuencia humana.

7. Después de la región marco conservada 3 de la nueva secuencia híbrida creada en la etapa 6, se pega la CDR3 completa de la secuencia de cadena pesada del anticuerpo de conejo. La secuencia CDR3 puede tener distintas longitudes, pero tiene normalmente de 5 a 19 aminoácidos de longitud. La región CDR3 y el comienzo de la siguiente región marco conservada 4 se han definido clásicamente y son identificables por los expertos en la técnica. Normalmente, el inicio de la región marco conservada 4, y por lo tanto tras el final de la CDR3 consiste en la secuencia WGXX... (donde X es habitualmente Q o P), sin embargo puede existir alguna variación en estos restos.

Ejemplo: La CDR3 de RbtVH (restos de aminoácidos numerados de 99-110) se añaden tras el final de la región marco conservada 3 en la secuencia humanizada indicada como VHH.

8. La región marco conservada 4 de cadena pesada del conejo, es que típicamente los últimos 11 restos de

aminoácidos de la región variable de cadena pesada y comienza como se indica en la etapa 7 anterior, y termina normalmente con la secuencia '...TVSS' se sustituye con la región marco conservada 4 humana homóloga más cercana de cadena pesada, habitualmente de la secuencia de la línea germinal. Frecuentemente esta región marco conservada 4 de cadena pesada humana tiene la secuencia 'WGQGTLVTVSS'. Es posible que se utilicen otras secuencias de región marco conservada 4 de cadena pesada humana que no sean las más homólogas o diferentes de otra manera sin afectar la especificidad, afinidad y/o inmunogenicidad del anticuerpo humanizado resultante. La secuencia de región marco conservada 4 de cadena pesada humana se añade al final de la secuencia variable de cadena pesada humanizada siguiendo inmediatamente la secuencia de CDR3 de la etapa 7 anterior. Este es ahora el final de la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada humanizada.

Ejemplo: En la Figura 2, la región marco conservada 4 (FR4) de la secuencia de cadena pesada RbtVH del conejo se muestra sobre la secuencia FR4 de cadena pesada humana homóloga. La secuencia de FR4 humana se añade a la secuencia variable de cadena pesada humanizada (VHh) justo después del final de la región CD3 añadida en la etapa 7 anterior.

Métodos de producción de anticuerpos y fragmentos de los mismos

La divulgación se refiere también a la producción de los anticuerpos descritos en el presente documento o fragmentos de los mismos. Los polipéptidos recombinantes correspondientes con los anticuerpos descritos en el presente documento o fragmentos de los mismos se secretan a partir de cepas poliploides, preferentemente diploides o tetraploides de levaduras competentes emparejadas. Se describen en el presente documento métodos para la producción de estos polipéptidos recombinantes en forma secretada durante periodos prolongados utilizando cultivos que comprenden levaduras poliploides, es decir, al menos desde varios días a una semana, más preferentemente al menos de un mes a varios meses, e incluso más preferentemente al menos 6 meses a un año o más largos. Estos cultivos de levaduras poliploides expresaran al menos 10-25 mg/litro de polipéptido, más preferentemente al menos 50-250 mg/litro, aún más preferentemente al menos 500-1000 mg/litro, y más preferentemente un gramo por litro o más del péptido(s) recombinante(s).

También se describe un par de células de levadura haploides marcado genéticamente que se transforman con vectores de expresión que comprenden subunidades de una proteína heteromultimérica deseada. Una célula haploide comprende un primer vector de expresión, y una segunda célula haploide comprende un segundo vector de expresión. Las células de levadura diploides se pueden transformar con uno o más vectores de expresión para proporcionar la expresión y secreción de uno o más de los polipéptidos recombinantes. Una única célula haploide se puede transformar con uno o más vectores y utilizarse para producir la levadura poliploide por estrategias de fusión o emparejamiento. U cultivo de levaduras diploides se puede transformar con uno o más vectores que proporcionen la expresión y secreción de un polipéptido o polipéptidos deseados. Estos vectores pueden comprender vectores, por ejemplo plásmidos alineados u otros productos de ADN lineal que se integran en el genoma de la célula de levadura aleatoriamente, por medio de recombinación homóloga, o utilizando una recombinasa tal como Cre/Lox o Flp/Frt. Opcionalmente, se pueden introducir vectores de expresión adicionales en las células haploides o diploides; o el primer y el segundo vectores de expresión pueden comprender secuencias codificantes adicionales; para la síntesis de heterotrímeros; heterotetrámeros; etc. Los niveles de expresión de los polipéptidos no idénticos se pueden calibrar individualmente, y ajustarse por medio de selección apropiada, vector de número de copias, fuerza y/o inducción del promotor y similares. Las células haploides transformadas se cruzan genéticamente o se fusionan. Las cepas diploides o tetraploides resultantes se utilizan para producir y secretar proteínas biológicamente funcionales y totalmente ensambladas, los anticuerpos humanizados que se describen en el presente documento o fragmentos de los mismos.

El uso de células diploides o tetraploides para la producción proteica proporciona beneficios inesperados. Las células se pueden cultivar con fines de producción, es decir, aumentando la escala, y durante periodos de tiempo ampliados, en condiciones que pueden ser perjudiciales para las células haploides, cuyas condiciones pueden incluir una alta densidad celular; cultivo en medios mínimos; cultivo a bajas temperaturas; cultivo estable en ausencia de presión selectiva, y que puedan proporcionar el mantenimiento de la integridad de la secuencia genética heteróloga y el mantenimiento de un alto nivel de expresión en el tiempo. Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, los inventores teorizan que estos beneficios pueden producirse, al menos en parte, por la creación de cepas diploides a partir de dos cepas haploides parentales distintas. Dichas cepas haploides pueden comprender numerosas mutaciones autotróficas menores cuyas mutaciones se complementan en las diploides o tetraploides, haciendo posible el crecimiento y el aumento de producción en condiciones altamente selectivas.

Las células de levadura de emparejamiento competentes transformadas proporcionan un método que hace posible el emparejamiento de subunidades de una proteína deseada. Las células haploides de levadura se transforman con cada uno de dos vectores de expresión, un primer vector que dirige la síntesis de una cadena polipeptídica y un segundo vector que dirige la síntesis de una segunda cadena polipeptídica no idéntica. las dos cepas haploides se emparejan para proporcionar un huésped diploide donde se puede obtener la producción de la proteína diana optimizada.

Opcionalmente, se proporcionan secuencias codificantes no idénticas adicionales. Dichas secuencias pueden estar

presentes en vectores de expresión adicionales o en el primer y segundo vectores de expresión. Como se sabe en la técnica, se pueden expresar independientemente múltiples secuencias codificantes a partir de promotores individuales; o se pueden expresar coordinadamente por medio de un "sitio de entrada del ribosoma interno" o "IRES", que es un elemento que promueve la entrada directa del ribosoma interno al codón de inicio, tal como ATG, o un cistrón (una región codificante de proteína), por lo que se da lugar a una traducción independiente de cap del gen. Los elementos IRES funcionales en levaduras están descritos por Thompson et al. (2001) P.N.A.S. 98:12866-12868.

Se pueden producir secuencias de anticuerpo en combinación con una cadena J secretora, que proporciona un aumento de la estabilidad de IgA (véase las Patentes de EE. UU. N° 5.959.177; y 5.202.422).

Las dos cepas de levadura haploide pueden ser cada una auxotróficas, y necesitar que el medio se suplemente para el cultivo de células haploides. El par de auxótrofos son complementarios, de manera que el producto diploide crecerá en ausencia de los suplementos necesarios para las células haploides. Muchos de dichos marcadores genéticos se conocen en levaduras, que incluyen las necesidades de aminoácidos (por ejemplo, met, lys, his, arg, etc.), nucleósidos (por ejemplo, ura3, ade1, etc.); y similares. Los marcadores aminoácidos se pueden preferir para los métodos de la invención. De manera alternativa, las células diploides que contienen los vectores deseados se pueden seleccionar por otros medios, por ejemplo, por el uso de otros marcadores, tales como proteína fluorescente verde, genes de resistencia a antibióticos, distintos marcadores genéticos dominantes, y similares.

Dos células haploides transformadas se pueden cruzar genéticamente y las cepas diploides que se producen de este evento de emparejamiento se seleccionan por sus necesidades nutricionales híbridas y/o su espectro de resistencia a los antibióticos. De manera alternativa, las poblaciones de las dos cepas haploides transformadas se convierten en esferoplastos y se fusionan, y la progenie diploide se regenera y se selecciona. Por cualquiera de los métodos, se pueden identificar las cepas diploides y se cultivan selectivamente basándose en su capacidad para crecer en medios diferentes que sus parentales. Por ejemplo, las células diploides pueden cultivarse en un medio mínimo que puede incluir antibióticos. La estrategia de síntesis diploide tiene ciertas ventajas. Las cepas diploides tienen el potencial de producir niveles aumentados de proteína heteróloga gracias a una complementación más amplia por mutaciones subyacentes, que pueden tener un impacto en la producción y/o secreción de proteína recombinante. Además, una vez que se han obtenido las cepas estables, se utiliza cualquier antibiótico para seleccionar las cepas que no es necesario que estén continuamente presentes en el medio de cultivo.

Como se ha señalado anteriormente, se puede transformar una levadura haploide con un único o con múltiples vectores y emparejarse o fusionarse con una célula no transformada para producir una célula diploide que contienen el vector o vectores. En otras realizaciones, se puede transformar una célula diploide con uno o más vectores que proporcionan la expresión y secreción de un polipéptido heterólogo deseado por la célula de levadura diploide.

Se pueden transformar dos cepas haploides con una biblioteca de polipéptidos, por ejemplo, una biblioteca de cadenas pesadas o ligeras de anticuerpo. Las células haploides que sintetizan los polipéptidos se emparejan con las células haploides complementarias. Las células diploides resultantes se exploran respecto a la proteína funcional. Las células diploides proporcionan un medio para conseguir a la vez rápidamente, convenientemente y de manera barata, un gran número de polipéptidos para el ensayo funcional. Esta tecnología es aplicable especialmente para la generación de productos proteicos heterodiméricos, donde los niveles de síntesis de subunidades son críticos para la expresión y secreción de la proteína funcional.

La relación del nivel de expresión de las dos subunidades se puede regular con el fin de maximizar la generación del producto. Se había demostrado anteriormente que los niveles de subunidades proteicas heterodiméricas tenía un impacto en la generación del producto final (Simmons LC, J Immunol Methods. 2002 Mayo 1:263(1-2):133-47). Se puede conseguir la regulación antes de la etapa de emparejamiento por selección mediante un marcador presente en el vector de expresión. Aumentando establemente el número de copias del vector, ese puede aumentar el nivel de expresión. En algunos casos, puede ser deseable aumentar el nivel de una cadena respecto a la otra, y alcanzar de esta manera una proporción equilibrada entre las subunidades del polipéptido. Los marcadores de resistencia a antibióticos son útiles para este fin, por ejemplo, el marcador de resistencia a Zeocina, resistencia G418, etc., y proporcionan un medio de enriquecimiento para cepas que contienen múltiples copias integradas de un vector de expresión en una cepa seleccionando los transformantes que son resistentes a altos niveles de Zeocina o G418. La relación apropiada, por ejemplo 1:1, 1:2, etc., de las subunidades de genes puede ser importante para una producción proteica eficaz. Incluso cuando se utiliza el mismo promotor para transcribir ambas unidades, otros muchos factores contribuyen al nivel final de la proteína que se expresa y por lo tanto, puede ser útil aumentar el número de copias de un gen codificado respecto al otro. De manera alternativa, las cepas diploides que producen altos niveles de un polipéptido, con respecto a las cepas con una única copia del vector, se crean emparejando dos cepas haploides, que tienen ambas múltiples copias de los vectores de expresión.

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión que se han descrito anteriormente, se emparejan para formar cepas diploides, y se cultivan en un medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir los promotores, seleccionar los transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Se conocen en la técnica varios medios mínimos adecuados para el cultivo de levaduras. Cualquiera de estos

medios se pueden suplementar según sea necesario con sales (tales como cloruro sódico, cálcico, magnésico, y fosfato), tampones (tales como fosfato, HEPES), nucleósidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos, elementos traza, y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario también se puede incluir a las concentraciones apropiadas que conocerían los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son los que se utilizaron anteriormente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto habituado en la técnica.

Las proteínas secretadas se recuperan del medio de cultivo. Puede ser útil un inhibidor de proteasas, tal como el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) para inhibir la degradación proteolítica durante la purificación, y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales. La composición se pueden concentrar, filtrar, dializar, etc., utilizando métodos conocidos en la técnica.

Las células diploides de la invención se cultivan con fines de producción. Dichos fines de producción incluyen deseablemente el cultivo en un medio mínimo, cuyo medio carece de aminoácido preformados y otras biomoléculas complejas, por ejemplo, medios que comprenden amoníaco como fuente de nitrógeno, y glucosa como fuente de energía y carbono, y sales como fuente de fosfato, calcio y similares. Preferentemente dicho medio de producción carece de agentes selectivos tales como antibióticos, aminoácidos, purinas, pirimidinas, etc. Las células diploides se pueden cultivar a alta densidad celular, por ejemplo, al menos aproximadamente 50 g/l; más habitualmente al menos aproximadamente 100 g/l; y puede ser al menos aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500 g/l o más.

El cultivo de las células en cuestión con fines de producción se puede llevar a cabo a bajas temperaturas, cuya temperatura se puede disminuir durante la fase log, durante la fase estacionaria, o en ambas. La expresión "baja temperatura" se refiere a temperatura de al menos aproximadamente 15 °C, más habitualmente al menos aproximadamente 17 °C, y puede ser aproximadamente 20 °C, y habitualmente no es mayor de aproximadamente 25 °C, más habitualmente no más de aproximadamente 22 °C. La baja temperatura habitualmente no es mayor de aproximadamente 28 °C. La temperatura de cultivo puede tener un impacto en la producción de proteínas de longitud completa secretadas en los cultivos de producción, y la disminución de la temperatura del cultivo de crecimiento puede aumentar fuertemente el rendimiento del producto intacto. La disminución de la temperatura parece que ayuda al tráfico intracelular mediante el plegamiento y las rutas de procesamiento post-traduccionales que utiliza el huésped para generar el producto diana, junto con la reducción de la degradación por proteasas celulares.

Los métodos de la divulgación proporcionan la expresión de proteína activa secretada, preferentemente una proteína de mamífero. "Anticuerpos activos" secretados, como se utiliza en el presente documento, se refiere a un multímero plegado correctamente de al menos dos cadenas emparejadas apropiadamente, que se unen precisamente a su antígeno equivalente. Los niveles de expresión de la proteína activa son habitualmente aproximadamente de 10-50 mg/litro de cultivo, más habitualmente al menos aproximadamente de 100 mg/litro, preferentemente al menos aproximadamente de 500 mg/litro, y puede ser de 1000 mg/litro o más.

Los métodos de la divulgación pueden proporcionar un aumento de estabilidad del huésped y de las secuencias codificantes durante la producción. La estabilidad se evidencia, por ejemplo, por el mantenimiento de altos niveles de expresión en el tiempo, donde el nivel de expresión inicial disminuye no más de aproximadamente un 20 %, habitualmente no más de un 10 %, y puede disminuir no más de aproximadamente un 5 % durante aproximadamente 20 duplicaciones, 50 duplicaciones, 100 duplicaciones, o más.

La estabilidad de la cepa también proporciona el mantenimiento de la integridad de la secuencia genética heteróloga en el tiempo, donde la secuencia de la secuencia codificante activa y las necesidades de los elementos reguladores transcripcionales se mantiene en al menos aproximadamente el 99 % de las células diploides, habitualmente en al menos el 99,9 % de las células diploides, y preferentemente en al menos aproximadamente el 99,99 % de las células diploides durante 20 duplicaciones, 50 duplicaciones, 100 duplicaciones, o más. Preferentemente, sustancialmente todas las células diploides mantendrán la secuencia de la secuencia codificante activa y las necesidades de los elementos reguladores transcripcionales.

Otros métodos de producción de anticuerpos son bien conocidos por los expertos habituados en la técnica. Por ejemplo, los métodos de producción de anticuerpos quiméricos se conocen bien ahora en la técnica. (Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N° 4.816.567 de Cabilly et al.; Morrison et al., P.N.A.S. USA, 81:8651-55 (1984); Neuberger, M.S. et al., Nature, 314:268-270 (1985); Boulianne, G.L. et al., Nature, 312:643-46 (1984)).

Al igual, ahora se conocen bien en la técnica otros métodos de producción de anticuerpos humanizados (Véase, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N° 5.530.101, 5.585.089, 5.693.762, y 6.180.370 de Queen et al; Patentes de EE. UU. N° 5.225.539 y 6.548.640 de Winter; Patentes de EE. UU. N° 6.054.297, 6.407.213 y 6.639.055 de Carter et al; Patente de EE. UU. N° 6.632.927 de Adair; Jones, P.T. et al, Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann, L., et al, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven, M, et al, Science, 239:1534-36 (1988)).

Los anticuerpos polipeptídicos de la invención que tienen una especificidad de unión por IL-6 también se pueden producir por construcción, utilizando técnicas convencionales bien conocidas por los expertos habituado en la

técnica, de un vector que contenga un operón y una secuencia de ADN que codifica una cadena pesada de anticuerpo en el cual la secuencia de ADN que codifica las CDR necesarias para la especificidad de los anticuerpos se derivan de una fuente celular no humana, preferentemente una fuente de células B de conejo, mientras que la secuencia de ADN de las partes restantes de la cadena del anticuerpo se deriva de una fuente celular humana.

5 Se produce un segundo vector de expresión utilizando los mismos medios convencionales bien conocidos por los expertos habitados en la técnica, conteniendo dicho vector un operón y una secuencia de ADN que codifica una cadena ligera de anticuerpo en el que la secuencia de ADN que codifica las CDR necesarias para la especificidad del anticuerpo se derivan de una fuente celular no humana, preferentemente una fuente de células B de conejo, mientras que la secuencia de ADN que codifica las partes restantes de la cadena del anticuerpo se deriva de una fuente celular humana.

10 Los vectores de expresión se transfectan en una células huésped por técnicas convencionales bien conocidas por los expertos habitados en la técnica para producir una célula huésped transfectada, se cultiva dicha célula huésped transfectada por técnicas convencionales bien conocidas por los expertos habitados en la técnica para producir dichos anticuerpos polipeptídicos.

15 La célula huésped se puede co-transfectar con los dos vectores descritos anteriormente, el primer vector de expresión que contiene el ADN que codifica un operón y un polipéptido derivado de cadena ligera y el segundo vector que contiene un ADN que codifica un operón y un polipéptido derivado de cadena pesada. Los dos vectores contienen diferentes marcadores genéticos, pero preferentemente alcanzan una expresión sustancialmente igual de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. De manera alternativa, se puede utilizar un único vector, el vector incluiría el ADN que codifica ambos polipéptidos de cadena pesada y ligera. Las secuencias codificantes de las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc.

20 Las células huésped que se utilizan para expresar los anticuerpos polipeptídicos pueden ser una célula bacteriana tal como E. coli, o una célula eucariota. Se puede utilizar una célula de mamífero de un tipo bien definido para este fin, tal como una célula de mieloma o una línea celular de ovario de hámster chino (CHO).

25 Los métodos generales por los que se pueden construir los vectores, los métodos de transfección necesarios para producir la célula huésped y los métodos de cultivo necesarios para producir los anticuerpos polipeptídicos de dichas células huésped incluyen todos ellos técnicas convencionales. Aunque la línea celular que se utiliza para producir el anticuerpo es preferentemente una línea celular de mamífero, se puede utilizar alternativamente cualquier otra línea celular adecuada, tal como una línea celular bacteriana como una cepa bacteriana derivada de E. coli, o una línea celular de levadura.

30 De manera similar, una vez que se producen los anticuerpos polipeptídicos se pueden purificar de acuerdo con procedimientos convencionales en la técnica, tal como por ejemplo, filtración de flujo cruzado, precipitación en sulfato amónico, cromatografía en columna de afinidad y similares.

35 Los anticuerpos polipeptídicos descritos en el presente documento también se pueden utilizar para el diseño y síntesis de miméticos de péptido o no péptidos que serían útiles para las mismas aplicaciones terapéuticas que los anticuerpos polipeptídicos de la invención. Véase, por ejemplo, Saragobi et al, Science, 253:792-795 (1991).

45 **Ensayos de exploración**

La divulgación también incluye ensayos de exploración diseñados para ayudar a la identificación de enfermedades y trastornos asociados con IL-6 en pacientes que presentan síntomas de una enfermedad o trastorno asociados a IL-6.

50 Los anticuerpos anti-IL-6, o fragmentos de unión a IL-6 de los mismos, se pueden utilizar para detectar la presencia de IL-6 en una muestra biológica que se obtiene de un paciente que presenta síntomas de una enfermedad o trastorno asociado con IL-6. La presencia de IL-6, o niveles elevados de la misma cuando se comparan con los niveles de IL-6 en la pre-enfermedad en una muestra biológica comparable, puede ser beneficioso para diagnosticar una enfermedad o trastorno asociado con IL-6.

También se describe un ensayo diagnóstico o de exploración para ayudar al diagnóstico de enfermedades o trastornos asociados con IL-6 en pacientes que presentan síntomas de una enfermedad o trastorno asociados a IL-6 que se identifican en el presente documento, que comprende el ensayo del nivel de la expresión de IL-6 en una muestra biológica de dicho paciente utilizando un anticuerpo anti-IL-6 modificado post-traduccionalmente o un fragmento de unión del mismo. El anticuerpo anti-IL-6 o fragmento de unión del mismo se puede modificar post-traduccionalmente incluyendo un resto detectable tal como se ha expuesto anteriormente en la divulgación.

60 El nivel de IL-6 en la muestra biológica se determina utilizando un anticuerpo anti-IL-6 modificado o un fragmento de unión del mismo como se ha expuesto en el presente documento, y comparando el nivel de IL-6 en la muestra biológica con un nivel de referencia de IL-6 (por ejemplo, el nivel de muestras biológicas normales). El clínico

experto entenderá que puede existir alguna variabilidad entre las muestras biológicas normales y los tendría en consideración cuando evalúe los resultados.

5 El ensayo descrito anteriormente también puede ser útil para el seguimiento de la enfermedad o trastorno, donde el nivel de IL-6 que se obtiene en una muestra de un paciente del que se cree que tiene una enfermedad o trastorno asociado con IL-6 se compara con el nivel de IL-6 en muestras biológicas anteriores del mismo paciente, con el fin de asegurarse si el nivel de IL-6 en dicho paciente ha cambiado, por ejemplo, con un régimen de tratamiento.

10 La invención también se refiere a un método de formación de imágenes in vivo que detectan la presencia de células que expresan IL-6 que comprende la administración de una cantidad diagnósticamente eficaz de una composición diagnóstica. Dicha formación de imágenes in vivo es útil para la detección y la formación de imágenes de tumores que expresan IL-6 o metástasis y sitios inflamatorios que expresan IL-6, por ejemplo, y se pueden utilizar como parte de una planificación de un régimen para diseñar un protocolo eficaz de tratamiento de cáncer o artritis.

15 Un clínico experto entenderá que una muestra biológica incluye, pero no se limita a, suero, plasma, orina, saliva, mucus, líquido pleural, líquido sinovial y líquido cefalorraquídeo.

Métodos para mejorar o reducir los síntomas de, o tratar, o prevenir, enfermedades y trastornos asociados con IL-6

20 En otra realización de la invención, los anticuerpos anti-IL-6, o fragmentos de los mismos, son útiles para mejorar o reducir los síntomas de, o tratar, o prevenir, enfermedades o trastornos asociados con IL-6. Los anticuerpos anti-IL-6 descritos en el presente documento, o fragmentos de los mismos, también se pueden administrar en una cantidad terapéuticamente eficaz a pacientes que necesitan el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con IL-6 en forma de una composición farmacéutica como se describe con más detalle posteriormente.

En una realización de la invención, los anticuerpos anti-IL-6 de acuerdo con las presentes reivindicaciones, o fragmentos de los mismos son útiles para mejorar o reducir los síntomas de, o tratar enfermedades y trastornos asociados con fatiga. Las enfermedades o trastornos asociados con fatiga incluyen, por no se limitan a, fatiga general, fatiga inducida por ejercicio, fatiga relacionada con el cáncer, fatiga relacionada con enfermedad inflamatoria, y síndrome de fatiga crónica. Véase, por ejemplo, Esper DH, et al, The cancer cachexia syndrome: a review of metabolic and clinical manifestations, *Nutr Clin Pract.*, Ago. de 2005 ;20 (4):369-76; Vgontzas AN, et al, IL-6 and its circadian secretion in humans, *Neuroimmunomodulation*, 2005;12(3):131-40; Robson-Ansley, PJ, et al, Acute interleukin-6 administration impairs athletic performance in healthy, trained male runners, *Can J Appl Physiol.*, Ago. de 2004 ;29(4):411-8; Shephard RJ., Cytokine responses to physical activity, with particular reference to IL-6: sources, actions, and clinical implications, *Crit Rev Immunol.*, 2002;22(3):165-82; Arnold, MC, et al, Using an interleukin-6 challenge to evaluate neuropsychological performance in chronic fatigue syndrome, *Psychol Med.*, Ago. de 2002 ;32(6):1075-89; Kurzrock R., The role of cytokines in cancer-related fatigue, *Cancer*, 2001 Sep 15;92(6 Suppl):1684-8; Nishimoto N, et al, Improvement in Castleman's disease by humanized anti-interleukin-6 receptor antibody therapy, *Blood*, 1 de Ene de 2000 ; 95 (1):56-61; Vgontzas AN, et al, Circadian interleukin-6 secretion and quantity and depth of sleep, *J Clin Endocrinol Metab.*, Ago. de 1999 ;84(8):2603-7; y Spath-Schwalbe E, et al, Acute effects of recombinant human interleukin 6 on endocrine and central nervous sleep functions in healthy men, *J Clin Endocrinol Metab.*, 1998 May;83(5):1573-9.

45 En una realización preferida de la invención, los anticuerpos anti-IL-6 de acuerdo con las presentes reivindicaciones, o fragmentos de los mismos, son útiles para mejorar o reducir los síntomas de, o tratar la caquexia. Las enfermedades o trastornos asociados con caquexia incluyen, pero no se limitan a, caquexia relacionada con el cáncer, caquexia relacionada con enfermedades cardíacas, caquexia relacionada con enfermedades respiratorias, caquexia relacionada con enfermedades renales, caquexia relacionada con la edad. Véase, por ejemplo, Barton, BE., Interleukin-6 and new strategies for the treatment of cancer, hyperproliferative diseases and paraneoplastic syndromes, *Expert Opin Ther Targets*, Ago. de 2005 ;9(4):737-52; Zaki MH, et al, CNTO 328, a monoclonal antibody to IL-6, inhibits human tumor-induced cachexia in nude mice, *Int J Cancer*, 2004 Sep 10;111(4):592-5; Trikha M, et al, Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence, *Clin Cancer Res.*, 2003 Oct 15;9(13):4653-65; Lelli G, et al, Treatment of the cancer anorexia-cachexia syndrome: a critical reappraisal, *J Chemother.*, 2003 Jun;15(3):220-5; Argiles JM, et al, Cytokines in the pathogenesis of cancer cachexia, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2003 Jul;6(4):401-6; Barton BE., IL-6-like cytokines and cancer cachexia: consequences of chronic inflammation, *Immunol Res.*, 2001;23(1):41-58; Yamashita JI, et al, Medroxyprogesterone acetate and cancer cachexia: interleukin-6 involvement, *Breast Cancer*, 2000;7(2):130-5; Yeh SS, et al, Geriatric cachexia: the role of cytokines, *Am J Clin Nutr.*, Ago. de 1999 ;70(2):183-97; Strassmann G, et al, Inhibition of experimental cancer cachexia by anti-cytokine and anti-cytokine-receptor therapy, *Cytokines Mol Ther.*, 1995 Jun;1(2):107-13; Fujita J, et al, Anti-interleukin-6 receptor antibody prevents muscle atrophy in colon-26 adenocarcinoma-bearing mice with modulation of lysosomal and ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathways, *Int J Cancer*, 1996 Nov 27;68(5):637-43; Tsujinaka T, et al, Interleukin 6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin 6 transgenic mice, *J Clin Invest.*, 1 de Ene de 1996 ;97(1):244-9; Emilie D, et al, Administration of an anti-interleukin-6 monoclonal antibody to patients with acquired immunodeficiency syndrome and lymphoma: effect on lymphoma growth and on B clinical Symptoms, *Blood*, 1994 Oct 15;84 (8):2472-

9; and Strassmann G, et al, Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia, *J Clin Invest.*, May 1992; 89(5):1681-4.

5 En otra realización de la invención los anticuerpos anti-IL-6 de acuerdo con las presentes reivindicaciones, o fragmentos de los mismos, son útiles para mejorar o reducir los síntomas de, o tratar enfermedades y trastornos autoinmunitarios. Las enfermedades y trastornos asociados con autoinmunidad incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES), artritis idiopática sistémica juvenil, psoriasis, artropatía psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), polimialgia reumática, arteritis de células gigantes, vasculitis autoinmunitaria, enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD), síndrome de Sjögren, enfermedad de Still de aparición en el adulto. En una realización preferida de la invención, los anticuerpos anti-IL-6 humanizados de acuerdo con las presentes reivindicaciones, o fragmentos de los mismos, son útiles para mejorar o reducir los síntomas, o tratar la artritis reumatoide y la artritis idiopática juvenil. Véase, por ejemplo, Nishimoto N., *Clinical studies in patients with Castleman's disease, Crohn's disease, and rheumatoid arthritis in Japan*, *Clin Rev Allergy Immunol.*, 2005 Jun;28(3):221-30; Nishimoto N, et al, Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial, *Arthritis Rheum.*, 2004 Jun;50(6):1761-9; Choy E., Interleukin 6 receptor as a target for the treatment of rheumatoid arthritis, *Ann Rheum Dis.*, 2003 Nov;62 Suppl 2:ii68-9; Nishimoto N, et al, Toxicity, pharmacokinetics, and dose-finding study of repetitive treatment with the humanized anti-interleukin 6 receptor antibody MRA in rheumatoid arthritis. Phase I/II clinical study, *J Rheumatol.*, 2003 Jul;30(7):1426-35; Mihara M, et al, Humanized antibody to human interleukin-6 receptor inhibits the development of collagen arthritis in cynomolgus monkeys, *Clin Immunol.*, 2001 Mar;98(3):319-26; Nishimoto N, et al, Anti-interleukin 6 receptor antibody treatment in rheumatic disease, *Ann Rheum Dis.*, 2000 Nov;59 Suppl 1:i21-7; Tackey E, et al, Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus, *Lupus*, 2004;13(5):339-43; Finck BK, et al, Interleukin 6 promotes murine lupus in NZB/NZW F1 mice, *J Clin Invest.*, Ago. de 1994 ;94 (2):585-91; Kitani A, et al, Autostimulatory effects of IL-6 on excessive B cell differentiation in patients with systemic lupus erythematosus: analysis of IL-6 production and IL-6R expression, *Clin Exp Immunol.*, Abr de 1992 ;88(1):75-83; Stuart RA, et al, Elevated serum interleukin-6 levels associated with active disease in systemic connective tissue disorders, *Clin Exp Rheumatol.*, Ene-Feb de 1995;13 (1):17-22; Mihara M, et al, IL-6 receptor blockage inhibits the onset of autoimmune kidney disease in NZB/W F1 mice, *Clin Exp Immunol.*, 1998 Jun;12(3):397-402; Woo P, et al, Open label phase II trial of single, ascending doses of MRA in Caucasian children with severe systemic juvenile idiopathic arthritis: proof of principle of the efficacy of IL-6 receptor blockade in this type of arthritis and demonstration of prolonged clinical improvement, *Arthritis Res Ther.*, 2005;7(6):R1281-8. Epub 2005 Sep 15; Yokota S, et al, Clinical study of tocilizumab in children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis, *Clin Rev Allergy Immunol.*, 2005 Jun;28(3):231-8; Yokota S, et al, Therapeutic efficacy of humanized recombinant anti-interleukin-6 receptor antibody in children with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis, *Arthritis Rheum.*, 2005 Mar;52(3):818-25; de Benedetti F, et al, Targeting the interleukin-6 receptor: a new treatment for systemic juvenile idiopathic arthritis?, *Arthritis Rheum.*, 2005 Mar;52(3):687-93; De Benedetti F, et al, Is systemic juvenile rheumatoid arthritis an interleukin 6 mediated disease?, *J Rheumatol.*, 1998 Feb;25(2):203-7; Ishihara K, et al, IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease, *Cytokine Growth Factor Rev.*, Ago.-Oct de 2002 ;13 (4-5):357- 68; Gilhar A, et al, In vivo effects of cytokines on psoriatic skin grafted on nude mice :involvement of the tumor necrosis factor (TNF) receptor, *Clin Exp Immunol.*, 1996 Oct;106(1):134-42; Spadaro A, et al, Interleukin-6 and soluble interleukin-2 receptor in psoriatic arthritis: correlations with clinical and laboratory parameters, *Clin Exp Rheumatol.*, Jul-Ago. de 1996;14 (4):413-6; Ameglio F, et al, Interleukin-6 and tumor necrosis factor levels decrease in the suction blister fluids of psoriatic patients during effective therapy, *Dermatology*, 1994;189(4):359-63; Wendling D, et al, Combination therapy of anti-CD4 and anti-IL-6 monoclonal antibodies in a case of severe spondylarthropathy, *Br J Rheumatol.*, Dic de 1996 ;35(12):1330; Gratacos J, et al, Serum cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1 beta and IFN-gamma) in ankylosing spondylitis: a close correlation between serum IL-6 and disease activity and severity, *Br J Rheumatol.*, 1994 Oct;33(10):927-31; Ito H., Treatment of Crohn's disease with anti-IL-6 receptor antibody, *J Gastroenterol.*, 2005 Mar;40 Suppl 16:32-4; Ito H, et al, A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease, *Gastroenterology*, Abr de 2004 ;126(4):989-96; discussion 947; Ito H., IL-6 and Crohn's disease, *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2003 Jun;2(2):12530; Ito H, et al, Anti-IL-6 receptor monoclonal antibody inhibits leukocyte recruitment and promotes T-cell apoptosis in a murine model of Crohn's disease, *J Gastroenterol.*, 2002 Nov;37 Suppl 14:56-61; Ito H., Anti-interleukin-6 therapy for Crohn's disease, *Curr Pharm Des.*, 2003;9(4):295-305; Salvarani C, et al, Acute-phase reactants and the risk of relapse/recurrence in polymyalgia rheumatica: a prospective follow-up study, *Arthritis Rheum.*, 2005 Feb 15;53(1):33-8; Roche NE, et al, Correlation of interleukin-6 production and disease activity in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis, *Arthritis Rheum.*, 1993 Sep;36(9):1286-94; Gupta M, et al, Cytokine modulation with immune gamma-globulin in peripheral blood of normal children and its implications in Kawasaki disease treatment, *J Clin Immunol.*, 2001 May;21(3):193-9; Noris M, et al, Interleukin-6 and RANTES in Takayasu arteritis: a guide for therapeutic decisions?, *Circulation*, 1999 Jul 6;100(1):55-60; Besbas N, et al, The role of cytokines in Henoch Schonlein purpura, *Scand J Rheumatol.*, 1997;26(6):456-60; Hirohata S, et al, Cerebrospinal fluid interleukin-6 in progressive Neuro-Behcet's syndrome, *Clin Immunol Immunopathol.*, Ene de 1997 ;82(1):12-7; Yamakawa Y, et al, Interleukin-6 (IL-6) in patients with Behcet's disease, *J Dermatol Sci.*, 1996 Mar;11(3):189-95; Kim DS., Serum interleukin-6 in Kawasaki disease, *Yonsei Med J.*, 1992 Jun;33(2):183-8; Lange, A., et al, Cytokines, adhesion molecules (E-selectin and VCAM-1) and graft-versus-host disease, *Arch. Immunol Ther Exp.*, 1995, 43(2):99-105; Tanaka, J., et al, Cytokine gene expression after allogeneic bone marrow transplantation, *Leuk. Lymphoma*, 1995 16(5-6):413-418; Dickenson, AM, et al, Predicting outcome in hematological stem cell transplantation, *Arch Immunol Ther Exp.*, 2002 50(6):371-8;

Zeiser, R, et al, Immunopathogenesis of acute graft-versus-host disease: implications for novel preventive and therapeutic strategies, *Ann Hematol.*, 2004 83(9):551-65; Dickinson, AM, et al, Genetic polymorphisms predicting the outcome of bone marrow transplants, *Br. J Haematol.*, 2004 127(5):479-90; y Scheinberg MA, et al, Interleukin 6: a possible marker of disease activity in adult onset Still's disease, *Clin Exp Rheumatol.*, Nov-Dic de 1996;14 (6):653-5.

En otra realización de la invención, los anticuerpos anti-IL-6 de acuerdo con las presentes reivindicaciones, o fragmentos de los mismos, son útiles para mejorar o reducir los síntomas de, o tratar enfermedades y trastornos asociados con el sistema esquelético. Las enfermedades y trastornos asociados con el sistema esquelético incluyen, pero no se limitan a, osteoartritis, osteoporosis y enfermedad de Paget del hueso. En una realización preferida de la invención, los anticuerpos anti-IL-6 humanizados de acuerdo con las presentes reivindicaciones, o fragmentos de los mismos, son útiles para mejorar o reducir los síntomas de, o tratar la osteoartritis. Véase, por ejemplo, Malemud CJ., Cytokines as therapeutic targets for osteoarthritis, *BioDrugs*, 2004;18(1):23-35; Westacott CI, et al, Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction?, *Semin Arthritis Rheum.*, 1996 Feb;25(4):254-72; Sugiyama T., Involvement of interleukin-6 and prostaglandin E2 in particular osteoporosis of postmenopausal women with rheumatoid arthritis, *J Bone Miner Metab.*, 2001;19(2):89-96; Abrahamsen B, et al, Cytokines and bone loss in a 5-year longitudinal study - hormone replacement therapy suppresses serum soluble interleukin-6 receptor and increases interleukin-1-receptor antagonist: the Danish Osteoporosis Prevention Study, *J Bone Miner Res.*, Ago. de 2000 ;15(8):1545-54; Straub RH, et al, Hormone replacement therapy and interrelation between serum interleukin-6 and body mass index in postmenopausal women: a population-based study, *J Clin Endocrinol Metab.*, 2000 Mar;85(3):1340-4; Manolagas SC, The role of IL-6 type cytokines and their receptors in bone, *Ann N Y Acad Sci.*, 1998 May 1;840:194-204; Ershler WB, et al, Immunologic aspects of osteoporosis, *Dev Comp Immunol.*, Nov-Dic de 1997;21(6):487-99; Jilka RL, et al, Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6, *Science*, 1992 Jul 3;257(5066):88-91; Kallen KJ, et al, New developments in IL-6 dependent biology and therapy: where do we stand and what are the options?, *Expert Opin Investig Drugs*, 1999 Sep;8(9): 1327-49; Neale SD, et al, The influence of serum cytokines and growth factors on osteoclast formation in Paget's disease, *QJM*, Abr de 2002 ;95 (4):233 - 40; Roodman GD, Osteoclast function In Paget's disease and multiple myeloma, *Bone*, Ago. de 1995 ;17(2 Suppl):57S-61S; Hoyland JA, et al, Interleukin-6, IL-6 receptor, and IL-6 nuclear factor gene expression in Paget's disease, *J Bone Miner Res.*, Ene de 1994 ;9(1):75-80; and Roodman GD, et al, Interleukin 6. A potential autocrine/paracrine factor in Paget's disease of bone, *J Clin Invest.*, Ene de 1992 ;89(1):46-52.

En otra realización de la invención, los anticuerpos anti-IL-6 de acuerdo con las presentes reivindicaciones, fragmentos de los mismos, son útiles para mejorar o reducir los síntomas de, o tratar enfermedades o trastornos asociados con el cáncer. Las enfermedades o trastornos asociados con cáncer incluyen, pero no se limitan a, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de próstata, leucemia, cáncer celular renal, enfermedad de Castleman multicéntrica, coger ovárico, resistencia a fármacos en la quimioterapia del cáncer y toxicidad de la quimioterapia en el cáncer. Véase, por ejemplo, Hirata T, et al, Humanized anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody induced apoptosis of fresh and cloned human myeloma cells in vitro, *Leuk Res.*, Abr de 2003 ;27(4):343-9; Bataille R, et al, Biologic effects of anti-interleukin-6 murine monoclonal antibody in advanced multiple myeloma, *Blood*, 1995 Jul 15;86 (2):685-91; Goto H, et al, Mouse anti-human interleukin-6 receptor monoclonal antibody inhibits proliferation of fresh human myeloma cells in vitro, *Jpn J Cancer Res.*, 1994 Sep;85(9):958-65; Klein B, et al, Murine anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for a patient with plasma cell leukemia, *Blood*, 1991 Sep 1;78(5):1198-204; Mauray S, et al, Epstein-Barr virus-dependent lymphoproliferative disease: critical role of IL-6, *Eur J Immunol.*, 2000 Jul;30(7):2065-73; Tsunenari T, et al, New xenograft model of multiple myeloma and efficacy of a humanized antibody against human interleukin-6 receptor, *Blood*, 1997 Sep 15;90(6):2437-44; Emilie D, et al, Interleukin-6 production in high-grade B lymphomas: correlation with the presence of malignant immunoblasts in acquired immunodeficiency syndrome and in human immunodeficiency virus-seronegative patients, *Blood*, 1992 Jul 15;80(2):498-504; Emilie D, et al, Administration of an anti-interleukin-6 monoclonal antibody to patients with acquired immunodeficiency syndrome and lymphoma: effect on lymphoma growth and on B clinical Symptoms, *Blood*, 1994 Oct 15; 84(8):2472-9; Smith PC, et al, Anti-interleukin-6 monoclonal antibody induces regression of human prostate cancer xenografts in nude mice, *Prostate*, 2001 Jun 15;48(1):47-53; Smith PC, et al, Interleukin-6 and prostate cancer progression, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2001 Mar;12(1):33-40; Chung TD, et al, Characterization of the role of IL-6 in the progression of prostate cancer, *Prostate*, 1999 Feb 15;38(3):199-207; Okamoto M, et al, Interleukin-6 as a paracrine and autocrine growth factor in human prostatic carcinoma cells in vitro, *Cancer Res.*, 1 de Ene de 1997 ;57(1):141-6; Reittie JE, et al, Interleukin-6 inhibits apoptosis and tumor necrosis factor induced proliferation of B-chronic lymphocytic leukemia, *Leuk Lymphoma*, Jun 1996;22(1-2):83-90, follow 186, color plate VI; Sugiyama H, et al, The expression of IL-6 and its related genes in acute leukemia, *Leuk Lymphoma*, Mar 1996;21(1-2):49-52; Bataille R, et al, Effects of an anti-interleukin-6 (IL-6) murine monoclonal antibody in a patient with acute monoblastic leukemia, *Med Oncol Tumor Pharmacother.*, 1993;10(4):185-8; Kedar I, et al, Thalidomide reduces serum C-reactive protein and interleukin-6 and induces response to IL-2 in a fraction of metastatic renal cell cancer patients who failed IL-2-based therapy, *Int J Cancer*, 2004 Jun 10;110(2):260-5; Angelo LS, Talpaz M, Kurzrock R, Autocrine interleukin-6 production in renal cell carcinoma: evidence for the involvement of p53, *Cancer Res.*, 2002 Feb 1;62(3):932-40; Nishimoto N, Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease, *Blood*, 2005 Oct 15;106(8):2627-32, Epub 2005 Jul 5; Katsume A, et al, Anti-interleukin 6 (IL-6) receptor antibody suppresses Castleman's disease like symptoms emerged in IL-6 transgenic mice, *Cytokine*, 21 de Dic de 2002 ;20(6):304-11; Nishimoto N, et al, Improvement in Castleman's disease by

humanized anti-interleukin-6 receptor antibody therapy, *Blood*, 1 de Ene de 2000 1;95(1):56-61; Screpanti I, Inactivation of the IL-6 gene prevents development of multicentric Castleman's disease in C/EBP beta-deficient mice, *J Exp Med.*, 1996 Oct 1;184(4):1561-6; Hsu SM, et al, Expression of interleukin-6 in Castleman's disease, *Hum Pathol.*, Ago. 1993 ;24(8):833-9; Yoshizaki K, et al, Pathogenic significance of interleukin-6 (IL 6/BSF-2) in Castleman's disease, *Blood*, Sep 1989;74(4):1360-7; Nilsson MB, et al, Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokine, *Cancer Res.*, 1 de Dic 2005 1;65(23):10794-800; Toutirais O, et al, Constitutive expression of TGF-beta I, interleukin-6 and interleukin-8 by tumor cells as a major component of immune escape in human ovarian carcinoma, *Eur Cytokine Netw.*, Oct-Dic 2003;14(4):246-55; Obata NH, et al, Effects of interleukin 6 on in vitro cell attachment, migration and invasion of human ovarian carcinoma, *Anticancer Res.*, Ene-Feb 1997;17 (1A):337-42; Dedoussis GV, et al, Endogenous interleukin 6 conveys resistance to cis-diamminedichloroplatinum-mediated apoptosis of the K562 human leukemic cell line, *Exp Cell Res.*, 1999 Jun 15;249(2):269-78; Borsellino N, et al, Blocking signaling through the Gp130 receptor chain by interleukin-6 and oncostatin M inhibits PC-3 cell growth and sensitizes the tumor cells to etoposide and cisplatin-mediated cytotoxicity, *Cancer*, 1 de Ene de 1999 1;85(1):134-44; Borsellino N, et al, Endogenous interleukin 6 is a resistance factor for cis-diamminedichloroplatinum and etoposide-mediated cytotoxicity of human prostate carcinoma cell lines, *Cancer Res.*, Oct 1995 15;55(20):4633-9; Mizutani Y, et al, Sensitization of human renal cell carcinoma cells to cis-diamminedichloroplatinum(II) by anti-interleukin 6 monoclonal antibody o anti-interleukin 6 receptor monoclonal antibody; *Cancer Res.*, 1995 Feb 1;55(3):590-6; Yusuf RZ, et al, Paclitaxel resistance: molecular mechanisms and pharmacologic manipulation, *Curr Cancer Drug Targets*, 2003 Feb;3(1):1-19; Duan Z, et al, Overexpression of IL-6 but not IL-8 increases paclitaxel resistance of U-20S human osteosarcoma cells, *Cytokine*, 2002 Mar 7;17(5):234-42; Conze D, et al, Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells, *Cancer Res.*, 15 de Dic de 2001 15;61(24):8851-8; Rossi JF, et al, Optimizing the use of anti-interleukin-6 monoclonal antibody with dexamethasone and 140 mg/m² of melphalan in multiple myeloma: results of a pilot study including biological aspects, *Bone Marrow Transplant*, Nov 2005;36(9):771-9; and Tonini G, et al, Oxaliplatin may induce cytokine-release syndrome in colorectal cancer patients, *J Biol Regul Homeost Agents*, Abr-Jun 2002;16(2):105-9.

En otra realización de la invención, los anticuerpos anti-IL-6 de acuerdo con las presentes reivindicaciones, o fragmentos de los mismos, son útiles para mejorar o reducir los síntomas de, o tratar, la enfermedad cardíaca isquémica, aterosclerosis, obesidad, diabetes, asma, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad cerebrovascular, fiebre, respuesta de fase aguda, alergias, anemia, anemia de inflamación (anemia de enfermedad crónica), hipertensión, depresión, depresión asociada con una enfermedad crónica, trombosis, trombocitosis, fallo cardíaco agudo, síndrome metabólico, aborto espontáneo, obesidad, prostatitis crónica, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria pélvica, lesión por re-perfusión, y rechazo de trasplantes. Véase por ejemplo, Tzoulaki I, et al, C-reactive protein, interleukin-6, and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in the general population: Edinburgh Artery Study, *Circulation*, 16 de Ago. de 2005 ;112(7):976-83, Epub Ago. de 2005 8; Rattazzi M, et al, C-reactive protein and interleukin-6 in vascular disease: culprits o passive bystanders?, *J Hypertens.*, 2003 Oct;21(10):1787-803; Ito T, et al, HMG-CoA reductase inhibitors reduce interleukin-6 synthesis in human vascular smooth muscle cells, *Cardiovasc Drugs Ther.*, 2002 Mar;16(2):121-6; Sten-vinkel P, et al, Mortality, malnutrition, and atherosclerosis in ESRD: what is the role of interleukin-6?, *Kidney Int Suppl.*, 2002 May;(80): 103-8; Yudkin JS, et al, Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link?, *Atherosclerosis*, 2000 Feb;148(2):209-14; Huber SA, et al, Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 1999 Oct;19(10):2364-7; Kado S, et al, Circulating levels of interleukin-6, its soluble receptor and interleukin-6/interleukin-6 receptor complexes in patients with type 2 diabetes mellitus, *Acta Diabetol.*, 1999 Jun;36(1-2):67-72; Sukovich DA, et al, Expression of interleukin-6 in atherosclerotic lesions of male ApoE-knockout mice: inhibition by 17beta-estradiol, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 1998 Sept;8(9):1498-505; Klover PJ, et al, Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity, *Endocrinology*, Ago. de 2005 ;146(8):3417-27, Epub 21 de Abr de 2005 ; Lee YH, et al, The evolving role of inflammation in obesity and the metabolic syndrome, *Curr Diab Rep.*, 2005 Feb;5(1):70-5; Diamant M, et al, The association between abdominal visceral fat and carotid stiffness is mediated by circulating inflammatory markers in uncomplicated type 2 diabetes, *J Clin Endocrinol Metab.*, 2005 Mar;90(3):1495-501, Epub 21 de Dic de 2004 ; Bray GA, Medical consequences of obesity, *J Clin Endocrinol Metab.*, 2004 Jun;89(6):2583 9; Klover PJ, et al, Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice, *Diabetes*, 2003 Nov;52 (11):2784-9; Yudkin JS, et al, Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link?, *Atherosclerosis*, 2000 Feb;148(2):209-14; Doganci A, et al, Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice, *Clin Rev Allergy Immunol.*, 2005 Jun;28(3):257-70; Doganci A, et al, The IL-6R alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo, *J Clin Invest.*, 2005 Feb;115(2):313 25, (Erratum in: *J Clin Invest.*, 2005 May;115(5):1388, Lehr, Hans A [added]); Stelmasiak Z, et al, IL-6 and sIL-6R concentration in the cerebrospinal fluid and serum of MS patients, *Med Sci Monit.*, Sep-Oct de 2001;7(5):914-8; Tilgner J, et al, Continuous interleukin-6 application in vivo via macroencapsulation of interleukin-6-expressing COS-7 cells induces massive gliosis, *Glia*, 2001 Sep;35(3):234-45; Brunello AG, et al, Astrocytic alterations in interleukin-6 Soluble interleukin-6 receptor alpha double-transgenic mice, *Am J Pathol.*, 2000 Nov;157(5):1485-93; Hampel H, et al, Pattern of interleukin-6 receptor complex immunoreactivity between cortical regions of rapid autopsy normal and Alzheimer's disease brain, *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.*, Ago. de 2005 ;255(4):269-78, Epub 2004 Nov 26; Cacquevel M, et al, Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease, *Curr Drug Targets*, Ago. de 2004 ;5(6):529-34; Quintanilla RA, et al, Interleukin 6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway, *Exp Cell Res.*, 15 de Abr de 2004 ; 295 (1):245-57; Gadiant RA, et al, Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and

destructive potentials, Prog Neu-robiol., Ago. de 1997 ;52(5):379-90; Hull M, et al, Occurrence of interleukin-6 in cortical plaques of Alzheimer's disease patients may precede transformation of diffuse into neuritic plaques, Ann N Y Acad Sci., 17 de Ene de 1996;777:205-12; Rallidis LS, et al, Inflammatory markers and in-hospital mortality in acute ischaemic stroke, Atherosclerosis, 30 de Dic de 2005 30; Emsley HC, et al, Interleukin-6 and acute ischaemic stroke, Acta Neurol Scand., 2005 Oct;112(4):273-4; Smith CJ, et al, Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome, BMC Neurol., 15 de Ene de 2004 ;4:2; Vila N, et al, Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke, Stroke, 2000 Oct;31(10):2325-9; y Tarkowski E, et al, Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the size of brain lesion in stroke, Stroke, Ago. de 1995 ;26(8):1393-8.

En otra realización de la invención, los anticuerpos anti-IL-6 de acuerdo con las presentes reivindicaciones, o fragmentos de los mismos, son útiles para mejorar o reducir los síntomas de, o tratar enfermedades o trastornos asociados con tormentas de citocinas. Las enfermedades o trastornos asociados con tormentas de citocinas incluyen, pero no se limitan a, enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD), gripe aviar, varicela, gripe pandémica, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), síndrome respiratorio agudo grave (SARS), sepsis, y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), Véase, por ejemplo, Cecil, R. L., Goldman, L., & Bennett, J. C. (2000). Cecil textbook of medicine. Philadelphia: W.B. Saunders; Ferrara JL, et al., Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1, Transplant Proc. 1993 Feb;25(1 Pt 2):1216-7; Osterholm MT, Preparing for the Next Pandemic, N Engl J Med. 2005 May 5;352(18):1839-42; Huang KJ, et al., An interferon-gamma-related cytokine storm in SARS patients, J Med Virol. 2005 Feb;75(2):185-94; y Cheung CY, et al., Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? Lancet. 7 de Dic de 2002 ;360(9348):1831-7.

Los anticuerpos anti-IL-6 que se describen en el presente documento, pueden ser útiles como ayuda a la debilidad.

Administración

Los anticuerpos anti-IL-6 que se describen en el presente documento, o los fragmentos de unión a IL-6 de los mismos, así como las combinaciones de dichos fragmentos de anticuerpo, se pueden administrar a un sujeto a una concentración de entre aproximadamente 0,1 y 20 mg/kg, tal como aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 1,6 mg/kg, o aproximadamente 4 mg/kg, de peso corporal del sujeto receptor. Los anticuerpos anti-IL-6 descritos en el presente documento, o los fragmentos de unión a IL-6 de los mismos, así como las combinaciones de dichos fragmentos de anticuerpo, se pueden administrar a un sujeto a una concentración de aproximadamente 0,4 mg/kg de peso corporal del sujeto receptor. Los anticuerpos anti-IL-6 descritos en el presente documento, o los fragmentos de unión a IL-6 de los mismos, así como las combinaciones de dichos fragmentos de anticuerpo, se pueden administrar a un sujeto receptor con una frecuencia de una vez cada veintiséis semanas o menos, tal como una vez cada dieciséis semanas o menos, una vez cada ocho semanas o menos, o una vez cada cuatro semanas, o menos.

Se entiende que la dosis eficaz puede depender de los atributos del sujeto receptor, tales como por ejemplo, la edad, el género, estado de gestación, índice de masa corporal, de masa magra corporal, afección o afecciones para las que se administra la composición, otras afecciones de la salud del sujeto receptor que pueden afectar al metabolismo o tolerancia de la composición, niveles de IL-6 en el sujeto receptor, y resistencia a la composición (por ejemplo, que surge en el paciente que desarrolla anticuerpos contra la composición). Un experto en la técnica sería capaz de determinar una dosificación eficaz y frecuencia de administración por medio de experimentación de rutina, por ejemplo, guiado por la divulgación el presente documento y las enseñanzas de Goodman, L. S., Gilman, A., Brunton, L. L., Lazo, J. S., & Parker, K. L. (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York: McGraw-Hill; Howland, R. D., Mycek, M. J., Harvey, R. A., Champe, P. C., & Mycek, M. J. (2006). Pharmacology. Lippincott's illustrated reviews. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; y Golan, D. E. (2008). Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy. Philadelphia, Pa., [etc.]: Lippincott Williams & Wilkins.

Los anticuerpos anti-IL-6 descritos en el presente documento, o fragmentos de unión a IL-6 de los mismos, así como las combinaciones de dichos fragmentos de anticuerpo, se pueden administrar a un sujeto en una formulación farmacéutica.

Una "composición farmacéutica" se refiere a una composición química o biológica adecuada para la administración a un mamífero. Dichas composiciones pueden formularse específicamente para la administración por medio de una o más de varias vías incluyendo pero no limitadas a la vía bucal, epicutánea, epidural, inhalación, intraarterial, intracardiaca, intracerebroventricular, intradérmica, intramuscular, intranasal, intraocular, intraperitoneal, intraespinal, intratecal, intravenosa, oral, parenteral, rectal por medio de un enema o supositorio, subcutánea, subdérmica, sublingual, transdérmica, y transmucosa. Además, se puede producir la administración por medio de inyección, polvos, líquidos, gel, gotas. u otros medios de administración.

Los anticuerpos anti-IL-6 descritos en el presente documento, o los fragmentos de unión a IL-6 del mismo, así como las combinaciones de dichos fragmentos de anticuerpo, se pueden administrar opcionalmente en combinación con

uno o más principios activos. Dichos principios activos incluyen analgésicos, antipiréticos, anti-inflamatorios, antibióticos, agentes antivirales y anti-citocinas. Los principios activos incluyen agonistas, antagonistas y moduladores de TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, IFN- α , IFN- γ , BAFF, CXCL13, IP-10, VEGF, EPO, EGF, HRG, Factor de crecimiento del hepatocito (HGF), Hecpídina, incluyendo anticuerpos reactivos contra cualquiera de los anteriores, y anticuerpos reactivos contra cualquiera de sus receptores. Los principios activos también incluyen ácidos 2-Arilpropiónicos, Aceclofenaco, Acemetacina, ácido Acetilsalicílico (Aspirina), Alclofenaco, Alminoprofeno, Amoxiprina, Ampirona, ácidos arilalcanoicos, Azapropazona, Benorilato/Benorilato, Benoxaprofeno, Bromfenaco, Carprofeno, Celecoxib, salicilato magnésico Colina, Clofezona, inhibidores de la COX-2, Dexibuprofeno, Dexketoprofeno, Diclofenaco, Diflunisal, Droxicam, Etenzamida, Etodolaco, Etoricoxib, Faislamina, ácidos fenoámicos, Fenobufeno, Fenoprofeno, ácido Flufenamico, Flunoxaprofeno, Flurbiprofeno, Ibuprofeno, Ibuproxam, Indometacina, Indoprofeno, Kebuzona, Ketoprofeno, Ketorolac, Lornoxicam, Loxoprofeno, Lumiracoxib, salicilato Magnésico, ácido Meclofenámico, ácido Mefenámico, Meloxicam, Metamizol, salicilato de Metilo, Mofebutazona, Nabumetona, Naproxeno, ácidos N-Arilantranilicos, Oxametacina, Oxaprozina, Oxicams, Oxifenbutazona, Parecoxib, Fenazona, Fenilbutazona, Fenilbutazona, Piroxicam, Pirprofeno, profenos, Proglumetacina, derivados de Pirazolidina, Rofecoxib, salicilato de Salicilo, Salicilamida, Salicilatos, Sulfinpirazona, Sulindac, Suprofeno, Tenoxicam, ácido Tiaprofenoico, ácido Tolfenamico, Tolmetina, y Valdecoxib. Los antibióticos incluyen Amikacina, Aminoglicosidos, Amoxicilina, Ampicilina, Ansamicinas, Arsfenamina, Azitromicina, Azlocilina, Aztreonam, Bacitracina, Carbacefem, Carbapenem, Carbenicilina, Cefaclor, Cefadroxilo, Cefalexina, Cefalotina, Cefalotina, Cefamandole, Cefazolina, Cefdinir, Cefditoren, Cefepima, Cefixima, Cefoperazona, Cefotaxima, Cefoxitina, Cefpodoxima, Cefprozil, Ceftazidima, Ceftibuteno, Ceftizoxima, Ceftibiprol, Ceftriaxona, Cefuroxime, Cefalosporinas, Cloranfenicol, Cilastatina, Ciprofloxacina, Claritromicina, Clindamicina, Cloxacilina, Colistina, Cotrimoxazol, Dalfopristina, Demeclociclina, Dicloxacilina, Diritromicina, Doripenem, Doxiciclina, Enoxacina, Ertapenem, Eritromicina, Etambutol, Flucloxacilina, Fosfomicina, Furazolidona, ácido Fusídico, Gatifloxacina, Geldanamycin, Gentamicina, Glucopeptidos, Herbimicina, Imipenem, Isoniazida, Kanamicina, Levofloxacina, Linezolid, Lomefloxacina, Loracarbef, Macrolidos, Mafenoida, Meropenem, Metilicina, Metronidazol, Mezlocilina, Minociclina, Monobactams, Moxifloxacina, Mupirocina, Nafcilina, Neomicina, Netilmicina, Nitrofurantoina, Norfloxacina, Ofloxacina, Oxacilina, Oxitetraciclina, Paromomicina, Penicilina, Penicilinas, Piperacilina, Platensimicina, Polimixina B, Polipeptidos, Prontosil, Pirazinamida, Quinolonas, Quinupristina, Rifampicina, Rifampina, Roxitromicina, espectinomycin, estreptomycin, Sulfacetamida, Sulfametizol, Sulfanilimida, Sulfasalazina, Sulfisoxazol, Sulfonamides, Teicoplanina, Telitromicina, Tetraciclina, Tetraciclina, Ticarcilina, Tinidazol, Tobramicina, Trimetoprim, Trimetoprim-Sulfametoxazol, Troleandomicina, Trovafloxacina, y Vancomicina. Los principios activos también incluyen Aldosterona, Beclometasona, Betametasona, Corticosteroides, Cortisol, acetato de Cortisona, acetato de Desoxicorticosterona, Dexametasona, acetato de Fludrocortisona, Glucocorticoides, Hidrocortisona, Metilprednisolona, Prednisolona, Prednisona, esteroides, y Triamcinolona. Los agentes antiviricos incluyen abacavir, aciclovir, aciclovir, adefovir, amantadina, amprenavir, una combinación de dosis fija antirretrovirica, un potenciador sinérgico antirretrovirico, arbidol, atazanavir, atripla, brivudina, cidofovir, combivir, darunavir, delavirdina, didanosina, docosanol, edoxudina, efavirenz, emtricitabina, enfuvirtida, entecavir, inhibidores de entrada, famciclovir, fomivirsen, fosamprenavir, foscarnet, fosfonet, inhibidor de fusion, ganciclovir, gardasil, ibacitabina, idoxuridina, imiquimod, imunovir, indinavir, inosina, inhibidor de integrasa, interferon, interferon tipo I, interferon tipo II, interferon tipo III, lamivudina, lopinavir, lovrida, maraviroc, MK-0518, moroxidina, nelfinavir, nevirapina, nexavir, análogos de nucleósido, oseltamivir, penciclovir, peramivir, pleconaril, podofilotoxina, inhibidor de proteasa, inhibidor de transcriptasa inversa, ribavirina, rimantadina, ritonavir, saquinavir, estavudina, tenofovir, tenofovir disoproxil, tipranavir, trifluridina, trizivir, trolantadina, trovada, valaciclovir, valganciclovir, vicriviroc, vidarabina, virmidina, zalcitabina, zanamivir, y zidovudina. También se contempla cualquier combinación adecuada de estos principios activos.

Un “excipiente farmacéutico” o “un excipiente farmacéuticamente aceptable” es un vehículo, habitualmente un líquido, en el que se formula un principio activo terapéutico. En una realización de la invención, el principio activo terapéutico es un anticuerpo humanizado que se describe en el presente documento, o uno o más fragmentos del mismo. El excipiente en general no proporciona una actividad farmacológica a la formulación, aunque puede proporcionar una estabilidad química y/o biológica, y características de liberación. Las formulaciones a modo de ejemplo se pueden encontrar, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Ed., Grennaro, A., Ed., 1995.

Como se utiliza en el presente documento “vehículo farmacéuticamente aceptable” o “excipiente” incluye cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción que son fisiológicamente compatibles. El vehículo puede ser adecuado para la administración parenteral. De manera alternativa, el vehículo puede ser adecuado para la administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, o sublingual. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles o polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dicho medio y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en el caso de que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la invención. También se pueden incorporar principios activos suplementarios en las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y

almacenamiento. La invención contempla que la composición farmacéutica esté presente en forma liofilizada. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para la alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido), y mezclas adecuadas de los mismos. La invención contempla adicionalmente la inclusión de un estabilizante en la composición farmacéutica.

En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Además, el polipéptido alcalino se puede formular en una formulación de liberación en un tiempo, por ejemplo, en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Los principios activos se pueden preparar con vehículos que protejan el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biocompatibles biodegradables, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y copolímeros poliláctico, poliglicólico (PLG) Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones son conocidos por los expertos en la técnica.

Para cada uno de los ejemplos mencionados, se pueden administrar los compuestos en una variedad de formas de dosificación. Se contemplan cualquiera de las formas de dosificación biológicamente aceptables que conocen los expertos habitados en la técnica, y combinaciones de las mismas. Ejemplos de dichas formas de dosificación incluyen, sin limitación, polvos reconstituibles, elixires, líquidos, soluciones, suspensiones, emulsiones, polvos, gránulos, partículas, micropartículas, gránulos dispersables, obleas, inhaladores, inhaladores de aerosol, parches, inhaladores de partículas, implantes, implantes de depósito, inyectables (incluyendo subcutáneos, intramusculares, intravenosos, e intradérmicos), infusiones, y combinaciones de los mismos.

La descripción anterior de distintas realizaciones ilustradas de la invención no pretende ser exhaustiva o que limiten la invención a la forma precisa desvelada. Como las realizaciones específicas de, y los ejemplos para la invención se describen en el presente documento con fines ilustrativos, son posibles distintas modificaciones equivalentes. Las enseñanzas proporcionadas en el presente documento de la invención se pueden aplicar con otros fines, distintos de los ejemplos descritos anteriormente.

Se pueden hacer en la invención estos y otros cambios a la luz de la descripción detallada anterior. En general, en las siguientes reivindicaciones, los términos utilizados no deberían considerarse que limiten la invención a las realizaciones específicas desveladas en la memoria descriptiva. En consecuencia, la invención no se limita a la divulgación, seno que en vez de eso el alcance de la invención se va a determinar completamente por las siguientes reivindicaciones.

La invención se puede practicar de maneras distintas a las descritas particularmente en la descripción y ejemplos anteriores. Son posibles numerosas modificaciones y variaciones de la descripción y ejemplos de la descripción anterior a la luz de las enseñanzas anteriores y, por lo tanto, se encuentran en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ciertas enseñanzas relacionadas con los métodos para obtener una población clínica de células B específicas de antígeno se desvelaban en el documento US20070269868 A1, publicado el 22 de noviembre de 2007.

Ciertas enseñanzas relacionadas con la producción de anticuerpos o fragmentos de los mismos utilizando el emparejamiento de levaduras competentes y los métodos correspondientes se desvelaban en la solicitud de patente de EE. UU. N° 11/429.053, presentada el 8 de mayo de 2006, (Publicación de solicitud de patente de EE. UU. N° US2006/0270045).

Ciertas enseñanzas relacionadas con los anticuerpos IL-6, métodos de producción de anticuerpos o fragmentos de los mismos utilizando el emparejamiento de levaduras competentes y los métodos correspondientes se desvelaban en el documento US20090238825 A1 publicado el 24 de septiembre de 2009.

Ciertos polinucleótidos y polipéptidos de anticuerpos anti-IL-6 se desvelan en el listado de secuencias que acompaña la presentación de esta solicitud de patente.

Los siguientes ejemplos se exponen de manera que proporcionen a los expertos habitados en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo hacer y utilizar la invención en cuestión, y no pretenden limitar el alcance de la invención. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, concentraciones, etc.) pero se deberían permitir algunos errores experimentales y desviaciones. A menos de que se indique otra cosa las partes son partes por peso, el peso molecular es el peso molecular medio, la temperatura es en grados centígrados; y la presión es o cerca de la atmosférica.

Ejemplos

Ejemplo 1 Producción de anticuerpos en un cultivo enriquecido de células B específicas de antígeno

5 Los paneles de anticuerpos se derivan inmunizando animales huésped de anticuerpo tradicionales para explotar la respuesta nativa inmunitaria contra un antígeno diana de interés. Normalmente, el huésped utilizado para la inmunización es un conejo u otro huésped que produce anticuerpos utilizando un proceso de maduración similar y proporciona una población de células B específicas de antígeno que produce anticuerpos de diversidad comparable, por ejemplo, diversidad epitópica. La inmunización inicial con antígeno puede llevarse a cabo utilizando adyuvante completo de Freund (CFA), y los refuerzos siguientes se efectúan con adyuvante incompleto. A los 10 aproximadamente 50-60 días después de la inmunización, preferentemente el día 55, se ensayaron los títulos de anticuerpo, y se inició el proceso de Selección de Anticuerpos (ABS) si se establecían los títulos apropiados. Los dos criterios clave para el inicio del ABS son un reconocimiento potente del antígeno y una actividad modificadora de función en el suero policlonal.

15 En el momento de establecerse los títulos de anticuerpo positivos, se sacrificaron los animales y se aislaron las fuentes de células B. Estas fuentes incluyen: el bazo, ganglios linfáticos, médula ósea, y células de sangre periférica (PBMC). Se generaron las suspensiones de células únicas, y se lavaron las suspensiones celulares para hacerlas compatibles para el almacenamiento a largo plazo a temperatura baja. Las células entonces normalmente se congelaban.

20 Para iniciar el proceso de identificación de anticuerpos, se descongeló una pequeña fracción de las suspensiones celulares, se lavó, y se colocó en un medio de cultivo celular. Estas suspensiones se mezclaron entonces con una forma biotinilada de antígeno que se iba a utilizar para generar la respuesta inmunitaria animal, y las células específicas de antígeno se recuperaron utilizando la metodología de selección celular con perlas magnéticas de Miltenyi. El enriquecimiento específico se llevó a cabo utilizando perlas de estreptavidina. La población enriquecida se recuperó y progresó en la siguiente fase de aislamiento de células B específicas.

Ejemplo 2 Producción de un cultivo que contiene células B específicas de antígeno clónicas

30 Las células B enriquecidas producidas de acuerdo con el Ejemplo 1 se colocaron entonces en placas a densidades celulares variables por pocillo en una placa de microtitulación de 96 pocillos. En general, esto es a 50, 100, 250, o 500 células por pocillo con 10 placas por grupo. El medio se suplementa con un 4 % de medio acondicionado para células T activadas de conejo junto con 50K células EL4B alimentadoras irradiadas congeladas. Estos cultivos se dejan sin molestias durante 5-7 días en cuyo momento se recolecta el anticuerpo contenido en el sobrenadante y se evalúa respecto a las propiedades diana en un grupo de ensayos separado. El sobrenadante restante se deja intacto y la placa se congela a -70 °C. En estas condiciones, el proceso de cultivo normalmente da como resultado pocillos que contienen una población de células mixta que comprende una población clónica de células B específicas de antígeno, es decir, un único pocillo contiene un único anticuerpo monoclonal específico del antígeno deseado.

Ejemplo 3 Exploración de los sobrenadantes con anticuerpos respecto a anticuerpos monoclonales de la especificidad y/o propiedades funcionales deseadas

45 Los sobrenadantes que contienen los anticuerpos derivados del pocillo que contiene la población de células B específicas de antígeno clónica que se produce de acuerdo con el Ejemplo 2 se exploran inicialmente en cuanto al reconocimiento de antígeno utilizando métodos ELISA. Esto incluye la inmovilización selectiva de antígeno (por ejemplo captura de antígeno biotinilado en una placa revestida con estreptavidina), revestimiento de la placa con antígeno no específico, o alternativamente, por medio de una estrategia de construcción de antígeno (por ejemplo, captura selectiva de antígeno seguido por adición de la pareja de unión para generar un complejo proteína heteromérica-antígeno). Los sobrenadantes de los pocillos positivos a antígeno se ensayan entonces opcionalmente en un ensayo de modificación de la función que es dependiente estrictamente del ligando. Dicho ejemplo es un ensayo de interacción proteína-proteína in vitro que recrea la interacción natural del ligando del antígeno con el receptor proteico recombinante. De manera alternativa, se utiliza una respuesta basada en células que es dependiente del ligando y fácilmente controlable (por ejemplo, respuesta de proliferación). El sobrenadante que presenta un reconocimiento de antígeno significativo y potencia se considera un pocillo positivo. Las células derivadas del pocillo positivo adicional se pasa a la fase de recuperación de anticuerpo.

Ejemplo 4 Recuperación de células B productoras de anticuerpo únicas de la especificidad por el antígeno deseada

60 Las células se aislaron de un pocillo que contiene una población clónica de células B específicas de antígeno (producida de acuerdo con el Ejemplo 2 o 3), que secreta una única secuencia de anticuerpo. Las células aisladas se ensayan entonces para aislar una única célula secretora de anticuerpo. Las perlas de estreptavidina Dynal se revisten con el antígeno diana biotinilado en un medio tampón para preparar microperlas que contienen antígeno compatible con la viabilidad celular. Después, las perlas cargadas de antígeno, las células productoras de anticuerpo del pocillo positivo, y el anticuerpo IgG H&L anti huésped marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (como se

ha señalado, el huésped puede ser cualquier huésped mamífero, por ejemplo, conejo, ratón, rata, etc.) se incuban juntos a 37 °C. Esta mezcla se re-pipetea entonces en alícuotas en un portaobjetos de cristal de forma que cada alícuota tenga de media una única célula B productora de anticuerpos. Las células secretoras de anticuerpo específico de antígeno se detectan entonces por microscopía de fluorescencia. El anticuerpo secretado se concentra localmente en las perlas adyacentes debido a la unión del antígeno y proporciona la información de localización basándose en la fuerza de la señal fluorescente. Las células secretoras de anticuerpo se identifican por medio de detección de FITC de los complejos antígeno-anticuerpo que se forman adyacentes a la célula secretora. La única célula que se encuentra en este complejo se recupera entonces utilizando un micromanipulador. La célula se congela instantáneamente en un tubo Eppendorf de PCR para su almacenamiento a -80 °C hasta que se inicia la recuperación de la secuencia de anticuerpo.

Ejemplo 5 Aislamiento de las secuencias de anticuerpo a partir de la célula B específica de antígeno

Se recuperan las secuencias de anticuerpo utilizando un método basado en PCR-RT combinada a partir de una única célula B aislada producida de acuerdo con el Ejemplo 4 o una célula B específica de antígeno aislada de la población celular B clónica obtenida de acuerdo con el Ejemplo 2. Se diseñaron los cebadores para hibridarse con las regiones conservadas y constantes de los genes de inmunoglobulina diana (pesada y ligera), tal como secuencias de inmunoglobulina de conejo, y se utiliza una etapa de recuperación de PCR de dos etapas anidadas para obtener la secuencia de anticuerpo. Se analizaron los amplicones de cada pocillo respecto a la recuperación y la integridad de tamaño. Los fragmentos resultantes se digieren entonces con AluI para marcar la huella de clonación de secuencia. Las secuencias idénticas presentan un patrón de fragmentación común en sus análisis electroforéticos. Significativamente, este patrón de fragmentación común que prueba la clonación celular se observa generalmente incluso los pocillos se colocaban en placas originalmente hasta a 1000 células/pocillo. Los fragmentos de amplicones de cadena pesada y ligera se digieren entonces con enzimas de restricción con HindIII y XhoI o HindIII y BsiWI para preparar las piezas respectivas de ADN para la clonación. Las digestiones resultantes se ligaron entonces en un vector de expresión y se transformaron en bacterias para la producción y propagación de plásmidos. Las colonias se seleccionaron para la caracterización de secuencias.

Ejemplo 6 Producción recombinante de anticuerpos monoclonales de especificidad antigénica y/o propiedades funcionales deseadas

Se establecen las secuencias de anticuerpo de longitud completa para cada pocillo que contienen un único anticuerpo monoclonal y se prepara un ADN miniprep utilizando la metodología en fase sólida de Qiagen. Este ADN se utiliza entonces para transfectar células de mamífero para producir un anticuerpo recombinante de longitud completa. El producto de anticuerpo en bruto se ensaya respecto al reconocimiento de antígeno y las propiedades funcionales para confirmar que las características originales se encuentran en el anticuerpo proteico recombinante. Si era apropiado, se completan las transfecciones mamíferas transitorias a gran escala, y se purifica el anticuerpo por medio de una cromatografía de afinidad con Proteína A. Se evalúa la Kd utilizando métodos convencionales (por ejemplo, Biacore) así como la CI50 en un ensayo de potencia.

Ejemplo 7 Preparación de anticuerpos que se unen a la IL-6 humana

Utilizando el protocolo de selección de anticuerpos descrito en el presente documento, se puede generar un extenso panel de anticuerpos. Los anticuerpos tienen una alta afinidad hacia IL-6 (un dígito simple o doble pM de la Kd) y presentan un potente antagonismo de IL-6 en sistemas de exploración basados en múltiples células (T1165 y HepG2). Además, la colección de anticuerpos presenta distintos modos de antagonismo hacia procesos dirigidos por la IL-6.

Estrategia de inmunización

Los conejos se inmunizaron con huIL-6 (R&R). La inmunización consistía en una primera inyección subcutánea (sc) de 100 µg en adyuvante completo de Freund (CFA) (Sigma) seguida por dos refuerzos, separados dos semanas, de 50 µg cada uno en adyuvante incompleto de Freund (IFA) (Sigma). Se extrajo sangre a los animales el día 55, y se determinaron los títulos del suero por ELISA (reconocimiento de antígeno) y por un ensayo de proliferación no reactivo (Promega) utilizando la línea celular T1165.

Evaluación del título de selección de anticuerpos

Se determinó el reconocimiento del antígeno revistiendo placas Immulon 4 (Thermo) con 1 µg/ml de huIL-6 (50 µl/pocillo) en solución salina tampón fosfato (PBS, Hyclone) durante una noche a 4 °C. El día del ensayo, se lavaron las placas 3 veces con PBS/Tween 20 (comprimidos PBST, Calbiochem). Las placas se bloquearon entonces con 200 µl/pocillo de gelatina de pescado al 0,5 % (FSG, Sigma) en PBS durante 30 minutos a 37 °C. La solución de bloqueo se retiró, y las placas se transfirieron. Las muestras de suero se hicieron (extracciones y pre-extracciones) en una dilución de partida de 1:100 (todas las diluciones se hicieron en FSG 50 µl/pocillo) seguido por diluciones 1:10 a través de la placa (la columna 12 se dejó en blanco para el control de fondo). Las placas se incubaron durante 30 minutos a 7 °C. Se lavaron las placas 3 veces con PBS/Tween 20. Se añadió a todos los pocillos un

anticuerpo de cabra anti-FC-HRP de conejo (Pierce) diluido 1:5000 (50 µl/pocillo), y las placas se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Las placas se lavaron como se ha descrito anteriormente. Se añadieron a las placas 50 µl/pocillo de TMB-Stable stop (Fitzgerald Industries), y se permitió que se desarrollara el color, generalmente durante 3 a 5 minutos. El desarrollo de la reacción se paró con 50 µl/pocillo de HCl 0,5 M. Las placas se leyeron a 450 nm.

- 5 La densidad óptica (DO) frente a la dilución se representó utilizando el software Graph Pad Prism, y se determinaron los títulos.

Evaluación funcional de títulos

- 10 La actividad funcional de las muestras se determinó por un ensayo de proliferación de T1165. Las células T1165 se mantuvieron de manera rutinaria en medio RPMI modificado (Hyclone), suplementado con Hepes, piruvato sódico, bicarbonato sódico, L-glutamina, alto en glucosa, penicilina/estreptomicina, un 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS) (todos los suplementos de Hyclone), 2 mercaptoetanol (Sigma), y 10 ng/ml de hUL-6 (R&D). El día del ensayo, se determinó la viabilidad celular por azul tripano (Invitrogen), y se sembraron las células a una densidad fija de 20.000 células/pocillo. Antes de la siembra, las células se lavaron dos veces en el medio descrito anteriormente sin IL-6 humana (centrifugando a 13000 rpm durante 5 minutos y desechando el sobrenadante). Después del último lavado, las células se suspendieron en el mismo medio utilizado para el lavado en un volumen equivalente a 50 µl/pocillo. Las células se mantuvieron aparte a temperatura ambiente.

- 20 Se añadieron las muestras de suero en una placa de 96 pocillos de fondo redondo (Costar), comenzando a 1:100, seguido por una dilución de 1:10 a través de la placa (columnas 2 a 10) a 30 µl/pocillo en replicados de 5 (filas B a F: la dilución hecha en el medio descrito anteriormente sin hUL-6). La columna 11 era solo de medio para el control de IL-6. Se añadieron a todos los pocillos 30 µl/pocillo de hUL-6 a una concentración 4x de la CE50 final (concentración determinada anteriormente) (se diluyó hUL-6 en el medio descrito anteriormente). Se incubaron los pocillos durante 1 hora a 37 °C para permitir que se produjera la unión del anticuerpo. Tras una hora se transfirieron 50 µl/pocillo de complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) a una placa de 96 pocillos de fondo plano (Costar) siguiendo el formato de mapa de placa que se siguió en la placa de fondo redondo. En la fila G, se añadieron 50 µl/pocillo de medio a todos los pocillos (columnas 2 a 11) para el control de fondo. Se añadieron los 50 µl/pocillo de la suspensión celular que se dejó aparte a todos los pocillos (columnas 2 a 11, filas B a G). En las columnas 1 y 12 y en las filas A y H, se añadieron 200 µl/pocillo para prevenir la evaporación de los pocillos de ensayo y para minimizar el efecto extremo. Las placas se incubaron durante 72 h a 37 °C en un 4 % de CO₂. A las 72 h, se añadieron 20 µl/pocillo de reactivos CellTiter96 (Promega) a todos los pocillos de ensayo según el protocolo del fabricante, y se incubaron las placas durante 2 h a 37 °C. A las 2 h, las placas se mezclaron suavemente en un agitador orbital para dispersar las células y permitir la homogeneidad en los pocillos de ensayo. Las placas se leyeron a una longitud de onda de 490 nm. La densidad óptica (DO) frente a la dilución se representó utilizando el software Graph Pad Prism, y se determinó el título funcional. Una placa de ensayo de control positivo se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente utilizando MAB2061 (R&D Systems) con una concentración de partida de 1 µg/ml (concentración final) seguido por diluciones 1:3 a lo largo de la placa.

40 Recolección de tejidos

Una vez que se establecieron los títulos aceptables, se sacrificaron los conejos. Se recolectaron los bazo, ganglios linfáticos, y sangre completa y se procesaron de la siguiente manera:

- 45 El bazo y los ganglios linfáticos se procesaron en una única suspensión celular disociando el tejido y presionándolo a través de una maya estéril de hilos a 70 µm (Fisher) con un émbolo de una jeringa de 200 cc. Las células se recolectaron en medio RPMI modificado descrito anteriormente sin hUL-6, pero con baja glucosa. Las células se lavaron dos veces por centrifugación. Tras el último lavado, la densidad celular se determinó por azul tripano. Las células se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos; se desechó el sobrenadante. Las células se re-suspendieron en el volumen apropiado de dimetilsulfóxido al 10 % (DMSO, Sigma) en FBS (Hyclone) y se dispensaron a 1 ml/vial. Los viales se almacenaron entonces a -70 °C durante 24 h antes de colocarlas en un depósito de nitrógeno líquido (LN₂) para el almacenamiento a largo plazo.

- 55 Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron mezclando la sangre completa con partes iguales del medio de baja glucosa descrito anteriormente sin FBS. Se depositaron cuidadosamente 35 ml de la mezcla de sangre completa en 8 ml de Lympholyte Conejo (Cedarlane) en un tubo cónico de 45 ml (Corning) y se centrifugó durante 30 minutos a 2500 rpm a temperatura ambiente sin freno. Tras la centrifugación. Las capas de PBMC se retiraron cuidadosamente utilizando una pipeta Pasteur de cristal (VWR), combinado, y se colocaron en un vial limpio de 50 ml. Se lavaron las células dos veces con el medio modificado descrito anteriormente por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se determinó la densidad celular por tinción con azul tripano. Tras el último lavado, se re-suspendieron las células en un volumen apropiado de medio con un 10 % de DMSO/FBS y se congelaron como se ha descrito anteriormente.

65 Cultivo de células B

El día del montaje del cultivo de células B, los viales de las PBMC, esplenocitos o ganglios linfáticos se descongelaron para su uso. Los viales se retiraron de los depósitos LN2 y se colocaron en un baño de agua a 37 °C hasta que se descongelaron. Los contenidos de los viales se transfirieron a tubos de centrifuga cónicos de 15 ml (Corning) y se añadieron lentamente 10 ml del RPMI modificado descrito anteriormente al tubo. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 1,5K rpm, y se desechó el sobrenadante. Se re-suspendieron las células en 10 ml de medio nuevo. Se determinó la densidad y viabilidad celular por azul tripano. Las células se lavaron de nuevo y se re-suspendieron a 1E07 células/80 µl de medio. Se añadió la hUL-6 biotinilada (B hUL-6) a la suspensión celular a la concentración final de 3 µg/ml y se incubó durante 30 minutos a 4 °C. La B hUL-6 no unida se retiró con dos lavados de 10 ml de tampón fosfato (PBF): PBS libre de Ca/Mg (Hyclone), 2 mM de etilendiamina de ácido tetraacético (EDTA), 0,5 % de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-libre de biotina). Tras el segundo lavado, se re-suspendieron las células a 1E07 células/80 µl de PBF. Se añadieron 20 µl de perlas con estreptavidina MACS® (Miltenyi)/10E7 células a la suspensión celular. Las células se incubaron a 4 °C durante 15 minutos. Se lavaron las células una vez con 2 ml de PBF/10E7 células. Tras el lavado, las células se re-suspendieron a 1E08 células/500 µl de PBF y se dejaron aparte. Se pre-aclaró una columna MS MACS® (Miltenyi) con 500 µl de PBF en una plataforma magnética (Miltenyi). La suspensión celular se aplicó a la columna por medio de un pre-filtro, y la fracción no unida se recolectó. La columna se lavó con 1,5 ml de tampón PBF. La columna se retiró de la plataforma magnética y se colocó en un tubo limpio Falcon de 5 ml de polipropileno. Se añadió 1 ml de tampón PBF en la parte superior de la columna, y se recolectaron las células seleccionadas como positivas. El rendimiento y viabilidad de la fracción celular positiva y negativa se determinó por tinción con azul tripano. La selección positiva daba un rendimiento del 1 % de la concentración celular de partida.

Se estableció una exploración celular de prueba para proporcionar información sobre los niveles de siembra para el cultivo. Tres grupos de 10 placas (un total de 30 placas) se sembraron con 40, 100 y 200 células B enriquecidas/pocillo. Además, cada pocillo contenía 50K células/pocillo de células EL-4.B5 (5.000 Rads) y un nivel apropiado de sobrenadante de células T (que varía de 1-5 % dependiendo de la preparación) en medio RPMI modificado alto en glucosa con un volumen final de 250 µl/pocillo. Los cultivos se incubaron durante 5 a 7 días a 37 °C en un 4 % de CO₂.

Identificación de las células B secretoras de anticuerpo selectivo

Los cultivos se ensayaron respecto al reconocimiento del antígeno y actividad funcional entre los días 5 y 7.

Exploración de reconocimiento de antígeno

El formato ELISA que se utiliza es el que se ha descrito anteriormente excepto los 50 µl de sobrenadante de los pocillos de los cultivos de células B (BCC) (las 30 placas) se utilizó como fuente de anticuerpo. El medio acondicionado se transfirió a las placas revestidas de antígeno. Tras identificarse los pocillos positivos, se retiró el sobrenadante y se transfirieron a la placa(s) maestra de 96 pocillos. Las placas de cultivo originales se congelaron retirando todo el sobrenadante excepto 40 µl/pocillo y añadiendo 60 µl/pocillo de DMSO al 16 % en FBS. Las placas se envolvieron en toallitas de papel para ralentizar la congelación y se colocaron a -70 °C.

Exploración de la actividad funcional

Las placas maestras se exploraron entonces respecto a la actividad funcional en el ensayo de proliferación de T1165 como se ha descrito anteriormente, excepto que la fila B tenía solo medio para el control de fondo, la fila C tenía medio + IL-6 para el control de proliferación positivo, y las filas D-G y las columnas 2-11 eran los pocillos del BCC (50 µl/pocillo, puntos simples). Se añadieron 40 µl de IL-6 a todos los pocillos excepto la fila de medio a 2,5 veces la concentración CE50 determinada por el ensayo. Tras una incubación de 1 h, el complejo Ac/Ag se transfirió a una placa de 96 pocillos de fondo plano de cultivo tisular (TC) tratado. Se añadieron 20 µl de suspensión celular en medio RPMI modificado sin hUL-6 (T1165 a 20.000 células/pocillo) a todos los pocillos (100 µl de volumen final por pocillo). Se restó el fondo, y los valores de DO observados se transformaron en % de inhibición.

Recuperación de células B

Las placas que contenían pocillos de interés se retiraron de -70 °C, y las células de cada pocillo se recuperaron con lavados de 5-200 µl de medio/pocillo. Los lavados se agruparon en un tubo de centrifuga estéril de 1,5 ml, y se aglomeraron las células durante 2 minutos a 1500 rpm.

El tubo se invirtió, se repitió la centrifugación, y el sobrenadante se retiró con cuidado. Las células se resuspendieron en 100 µl/tubo de medio. Se añadieron 100 µl de dynaperlas M280 estreptavidina revestidas de IL-6 biotinilada (Invitrogen) y 16 µl de anticuerpo de cabra anti IgG H&L-FITC de conejo diluido 1:100 en medio a la suspensión celular.

Se retiraron 20 µl de la suspensión de células/perlas/FITC, y se prepararon gotas de 5 µl en un portaobjetos de cristal (Corning) previamente tratado con Sigmacote (Sigma), de 35 a 40 gotas/portaobjetos. Se añadió una barrera impermeable de aceite de parafina (JT Baker) para sumergir las gotas, y se incubó el portaobjetos durante 90

minutos a 37 °C, un 4 % de CO₂ en oscuridad.

Las células B específicas que producen anticuerpos se pueden identificar por el anillo fluorescente alrededor de ellas debido a la secreción de anticuerpo, el reconocimiento del antígeno biotinilado asociado a las perlas, y la detección posterior por la detección del reactivo de IgG fluorescente. Una vez que se identifica una célula de interés, la célula en el centro del anillo fluorescente se recuperó por medio de un micromanipulador (Eppendorf). La célula única que sintetiza y exporta el anticuerpo se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 250 µl y se colocó en hielo seco. Tras la recuperación de todas las células de interés, se transfirieron a -70 °C para el almacenamiento a largo plazo.

10 Ejemplo 8 Expresión en células de levadura

Genes de anticuerpo: Se clonaron y se construyeron genes que dirigían la síntesis de un anticuerpo monoclonal humanizado quimérico de conejo.

15 Vector de expresión: El vector contiene los siguientes componentes funcionales: 1) un origen de replicación ColE1 mutante, que facilita la replicación del vector plásmido en células de la bacteria *Escherichia coli*; 2) un gen bacteriano *Sh ble*, que confiere resistencia al antibiótico Zeocina y funciona como el marcador genético para las transformaciones tanto de *E. coli* como de *P. pastoris*; 3) un casete de expresión compuesto por el promotor del gen de la gliceraldehído deshidrogenasa (gen GAP), fusionado a secuencias que codifican la secuencia líder de pre pro secreción del factor de emparejamiento alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, seguido por secuencias que codifican una señal de terminación transcripcional de *P. pastoris* del gen I de alcohol oxidasa de *P. pastoris* (AOX1). El gen indicador de resistencia a Zeocina proporciona un medio de enriquecimiento para cepas que contienen múltiples copias integradas de un vector de expresión en una cepa seleccionando los transformantes que sean resistentes a altos niveles de Zeocina.

25 Cepas de *P. pastoris*: Se pueden utilizar las cepas de *P. pastoris* *met1*, *lys3*, *ura3* y *ade1*. Aunque se podrían utilizar cualquiera de dos grupos complementarios de cepas auxotróficas para la construcción y mantenimiento de cepas diploides, estas dos cepas son especialmente adecuadas para este método por dos razones. Primero, crecen más lentamente que las cepas diploides que son el resultado de su emparejamiento o fusión. Por lo tanto, si un pequeño número de células *ade1* o *ura3* haploides permanecen presentes en un cultivo o aparecen por medio de meiosis u otro mecanismo, la cepa diploide debería superarlas en el cultivo.

35 La segunda es que es fácil controlar el estado sexual de estas cepas ya que las colonias Ade+ que aparecen de su emparejamiento son de color crema o blanco normal, mientras que las células de cualquiera de las cepas que son mutantes *ade1* haploides formarán una colonia con un color rosa distintivo. Además, cualquiera de las cepas que son mutantes de *ura3* haploides son resistentes al fármaco ácido 5-fluoro-orótico (FOA) y se pueden identificar sensiblemente poniendo en placas las muestras de un cultivo en placas con medio mínimo + uracilo con FOA. En estas placas, solamente las células *ura3* mutantes que necesitan uracilo (presumiblemente haploide) pueden crecer y formar colonias. Por lo tanto, con las cepas parentales haploides marcadas con *ade1* y *ura3*, se puede controlar fácilmente el estado sexual de las cepas diploides productoras de anticuerpo resultantes (haploides frente a diploides).

Métodos

45 *Construcción de vectores de expresión pGAPZ-alfa para la transcripción de genes de cadena pesada y ligera de anticuerpo.* Los fragmentos humanizados de cadena ligera y pesada se clonaron en los vectores de expresión pGAPZ por medio de un proceso dirigido por PCR. Las construcciones humanizadas recuperadas se sometieron a amplificación en condiciones del kit de KOD polimerasa (Novagen) ((1) 94 °C, 2 minutos; (2) 94 °C, 30 segundos; (3) 55 °C, 30 segundos; (4) 72 °C, 30 segundos-se hace un ciclo de las etapas 2-4, 35 veces; (5) 72 °C, 2 minutos empleando los siguientes cebadores (1) de cadena ligera directo AGCGCTTATTCCGCTATCCAGATGACC CAGTC- el sitio de Afel está subrayado simple. El final de la secuencia de señal HSA está subrayada doble, seguida por la secuencia de la región variable de cadena ligera madura (no subrayado); el inverso es CGTACGTTTGATTC CACCTTG.

55 Cebador inverso de la región variable de cadena ligera. El sitio BsiWI está subrayado, seguido por el complemento inverso para el extremo 3' de la región variable de cadena ligera. La digestión con enzimas de restricción con Afel y BsiWI hace posible la inserción en fase con el vector pGAPZ utilizando la secuencia líder HAS humana en fase con la región constante de cadena ligera kappa humana para la exportación. (2) Se llevó a cabo una estrategia similar para la cadena pesada. El cebador directo empleado es AGCGCTTATTCCGAGGTGCAGCTG GTGGAGTC. El sitio Afel está subrayado simple. El final de la secuencia de señal está subrayado doble, seguido por la secuencia de la región variable de cadena pesada madura (no subrayada). El cebador inverso de cadena pesada es CTCGAGACGGTGACGAGGGT. El sitio XhoI está subrayado seguido por el complemento inverso para el extremo 3' de la región variable de la cadena pesada. Esto hace posible la clonación de la cadena pesada en fase con la región CH1-CH2-CH3 de IgG-γ1 insertada previamente en el pGAPZ utilizando una estrategia de clonación direccional comparable.

Transformación de vectores de expresión en cepas huésped ade1, ura3, met1, y lys3 de P. pastoris. Todos los métodos utilizados para la transformación de cepas haploides de *P. pastoris* y la modificación genética del ciclo sexual de *P. pastoris* se describen en Higgins, D. R., y Cregg, J. M., Eds. 1998. *Pichia* Protocols. Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ.

5 Antes de la transformación, cada vector de expresión se alinea en las secuencias del promotor GAP con AvrII para dirigir la integración de los vectores en el locus del promotor GAP del genoma de *P. pastoris*. Las muestras de cada vector se transforman entonces individualmente en los cultivos electrocompetentes de las cepas ade1, ura3, met1 y lys3 por electroporación, y se seleccionan los transformantes satisfactorios con placas YPD con Zeocina mediante su resistencia a este antibiótico. Las colonias resultantes se seleccionan, se dividen en colonias únicas en placas YPD con Zeocina y entonces se examinan respecto a la presencia de la inserción genética del anticuerpo por un ensayo PCR en el ADN genómico extraído de cada cepa respecto a la inserción del gen de anticuerpo apropiado y/o la capacidad de cada cepa para sintetizar una cadena de anticuerpo por un método de elevación/Inmunotransferencia de colonias (Wung et al. Biotechniques 21 808-812 (1996)). Las cepas ade1, met1 y lys3 que expresaban una de las tres construcciones de cadena pesada se recolectan para las construcciones diploides junto con la cepa haploide ura3 que expresaba el gen de cadena ligera. Las haploides que expresaban los genes de cadena pesada se emparejan con las ura3 haploides de cadena ligera para generar la diploide que secreta la proteína.

20 *Emparejamiento de las cepas haploides que sintetizan una única cadena de anticuerpo y la selección de los derivados diploides que sintetizan los anticuerpos tetraméricos funcionales.* Para emparejar las cepas haploides de *P. pastoris*, cada cepa ade1 (o met1 o lys3) productora de cadena pesada que se va a cruzar se siembra en estrías a lo largo de una placa YPD rica y la cepa ura3 productora de cadena ligera se siembra en estrías a lo largo de una segunda placa YPD (~ 10 estrías por placa). Tras uno o dos días de incubación a 30 °C, las cepas de una placa que contenía las cepas de cadena pesada y una placa que contenía las cepas ura3 de cadena ligera se transfirieron a un tejido aterciopelado estéril en un bloque de colocación en placa de replicación con un patrón de trama cruzada de manera que cada cepa de cadena pesada contiene un área de células mezcladas con cada cepa de cadena ligera. Las células de la placa de replicación de la división entrecruzada se transfirieron entonces a una placa de emparejamiento y se incubaron a 25 °C para estimular el inicio del emparejamiento entre las cepas. Tras dos días, las células de las placas de emparejamiento se transfieren de nuevo a un terciopelo estéril en un bloque de colocación en placa de replicación y luego se transfirieron a placas con medio mínimo. Estas placas se incubaron a 30 °C durante tres días para permitir el crecimiento selectivo de colonias de las células diploides prototróficas. Las colonias que aparecían se recogieron y se sembraron en estrías en una segunda placa de medio mínimo para aislar colonias únicas y purificar cada cepa diploide. Las líneas celulares diploides resultantes se examinaron entonces respecto a la producción de anticuerpos.

Las supuestas cepas diploides se ensayaron para demostrar que eran diploides y contenían ambos vectores de expresión para la producción de anticuerpos. Para la diploidía, las muestras de una cepa se diseminaron en placas de emparejamiento para estimular que se sometieran a meiosis y la formación de esporas. Los productos esporulados haploides se recolectaron y se ensayaron respecto al fenotipo. Si un porcentaje significativo de los productos esporulados resultantes eran auxótrofos simples o dobles se podía concluir que la cepa original debía haber sido diploide. Las cepas diploides se examinaron respecto a la presencia de ambos genes de anticuerpo extrayendo el ADN genómico de cada una y utilizando este ADN en reacciones PCR específicas de cada gen.

45 *Fusión de cepas haploides que sintetizan una única cadena de anticuerpo y selección de derivados diploides que sintetizan anticuerpos tetraméricos funcionales.* Como alternativa al procedimiento de emparejamiento descrito anteriormente, se convirtieron en esferoplastos los cultivos individuales de las cepas ade1 y ura3 haploides que producían una única cadena de anticuerpo y sus esferoplastos resultantes se fusionaron utilizando polietilenglicol/CaCl₂. Las cepas haploides fusionadas se embebieron entonces en agar que contenía un 1 M de sorbitol y un medio mínimo para permitir que las cepas diploides generaran su pared celular y crecieran en colonias visibles. Las colonias visibles se recogieron del agar, se sembraron en estrías en una placa de medio mínimo, y las placas se incubaron durante dos días a 30 °C para generar colonias de las células únicas de las líneas celulares diploides. Las supuestas líneas celulares diploides se examinaron entonces respecto a la diploidía y la producción de anticuerpos como se ha descrito anteriormente.

55 *Purificación y análisis de anticuerpos.* Se derivó una cepa diploide para la producción de anticuerpo de longitud completa por medio de emparejamiento de la met1 de cadena ligera y lys de cadena pesada utilizando los métodos que se han descrito anteriormente. El medio de cultivo de los matraces con agitado o los cultivos de fermentación de cepas diploides de expresión de *P. pastoris* se recolectaron y se examinaron respecto a la presencia del anticuerpo proteico mediante SDS-PAGE e Inmunotransferencia utilizando anticuerpos dirigidos contra las cadenas pesada y ligera de IgG humana, o específicamente contra la cadena pesada de IgG.

65 Para purificar los anticuerpos secretados por levaduras, se pasaron los medios clarificados de los cultivos productores de anticuerpo a través de una columna de proteína A y tras lavar con 20 mM de fosfato sódico, pH 7,0, tampón de unión, se eluyó la proteína A unida a la proteína utilizando 0,1 M de tampón glicina HCl, pH 3,0. Las fracciones que contenían la mayoría de proteína total se examinaron por SDS-PAGE teñida con azul Coomassie e

Inmunotransferencia del anticuerpo proteico. El anticuerpo se caracterizó utilizando el ELISA descrito anteriormente para el reconocimiento de la IL-6.

5 *Ensayo para la actividad del anticuerpo.* El anticuerpo humanizado derivado de la levadura recombinante se evaluó respecto a la actividad funcional por medio del ensayo de proliferación celular de T1165 dirigido por IL-6 y el ensayo de haptoglobina HepG2 estimulada por IL-6 que se ha descrito anteriormente.

10 **Ejemplo 9 Neutralización de respuesta en fase aguda por administración intravenosa de anticuerpo anti-IL-6 Ab1**

10 La IL-6 humana puede provocar una respuesta de fase aguda en ratas, y una de las proteínas principales de fase aguda que se estimula en ratas es la α -2 macroglobulina (A2M). Se diseñó un estudio para evaluar la dosis de anticuerpo Ab1 necesario para impedir la respuesta de A2M a una única inyección s.c. de 100 μ g de IL-6 humana puesta una hora después de diferentes dosis (0,03, 0,1, 0,3, 1 y 3 mg/kg) de anticuerpo Ab1 administrado por vía intravenosa (n = 10 ratas/nivel de dosis) o IgG1 policlonal humana como control (n = 10 ratas). Se recuperó el plasma y se cuantificó la A2M por medio de un kit ELISA sándwich comercial (ICL Inc., Newberg OR; n° de cat.- E-25A2M). El punto final era la diferencia de la concentración de A2M en el plasma en el punto de tiempo de 24 horas (post-Ab1). Los resultados se presentan en la Figura 4.

15 La DI50 del anticuerpo Ab1 era de 0,1 mg/kg con supresión completa de la respuesta de A2M en la de 0,3 mg/kg. Esto establece firmemente que la neutralización in vivo de la IL-6 humana se puede conseguir con el anticuerpo Ab1.

20 **Ejemplo 10 Estudio 1 del Modelo de caquexia con RXF393**

25 **Introducción**

30 La línea celular de cáncer celular renal humano, RXF393 produce una profunda pérdida de peso cuando se trasplanta en ratones desnudos atímicos. La pérdida de peso comienza alrededor del día 15 tras el trasplante con el 80 % de los animales perdiendo hasta un 30 % de su peso corporal total el día 18-20 tras el trasplante. RXF393 secreta IL-6 humana y la concentración plasmática de IL-6 humana en estos animales es muy alta aproximadamente de 10 ng/ml. La IL-6 humana se puede unir al receptor de IL-6 soluble y activar las respuestas a IL-6 en el ratón. La IL-6 humana es aproximadamente 10 veces menos potente que la IL-6 murina en la activación de las respuestas a IL-6 en el ratón. Los objetivos de este estudio eran determinar el efecto del anticuerpo Ab1, sobre la supervivencia, peso corporal, proteína seroamiloide A, y los parámetros de hematología en ratones desnudos atímicos trasplantados con la línea celular de cáncer de células renales humano, RXF393.

35 **Métodos**

40 Se implantó en ochenta ratones desnudos atímicos machos de 6 semanas de edad fragmentos tumorales de RXF393 (30-40 mg) por vía subcutánea en el costado derecho. Los animales se dividieron entonces en ocho grupos de diez ratones. Se les administró a tres grupos el anticuerpo Ab1 a 3 mg/kg, 10 mg/kg, o 30 mg/kg por vía intravenosa semanalmente el día 1, día 8, día 15 y día 22 tras el trasplante (grupos de progresión). Se administró a otros tres grupos el anticuerpo Ab1 a 3 mg/kg, 10 mg/kg, o 30 mg/kg por vía intravenosa semanalmente el día 8, día 15 y día 22 tras el trasplante (grupos de regresión). Finalmente se administró a un grupo de control IgG policlonal humana a 30 mg/kg y se administró a un segundo grupo de control solución salina tampón fosfato por vía intravenosa el día 1, día 8, día 15 y día 22 tras el trasplante.

45 Se practicó la eutanasia a los animales el día 28, cuando el tumor alcanzaba los 4.000 mm³ o si se debilitaban (> 30 % de pérdida de peso corporal). Los animales se pesaban los días 1, 6 y luego diariamente desde los días 9 a 28 tras el trasplante. Se utilizó el porcentaje medio de peso corporal (MPBW) como parámetro primario para controlar la pérdida de peso durante el estudio. Este se calculaba de la siguiente manera: (peso corporal – peso del tumor)/línea basal de peso corporal x 100. El peso del tumor se midió los días 1, 6, 9, 12, 15, 18, 22, 25 y 28 tras el trasplante. Se recolectó la sangre bajo anestesia de cinco ratones de cada grupo los días 5 y 13 y cuando se practicó la eutanasia de los diez ratones de cada grupo (el día 28 en la mayoría de los casos). Se analizó la sangre respecto a la hematología y la concentración de proteína seroamiloide A (SAA). Se tomaron muestras de sangre de un grupo adicional de 10 ratones desnudos atímicos machos de 6 semanas de edad que no albergaban el tumor para la estimación de la hematología y la concentración de SAA para tener un grupo de valores de línea basal.

50 **Resultados – supervivencia**

55 Ningún animal se sometió a eutanasia o se murió en ninguno de los grupos de Ab1 antes de la fecha de terminación del estudio del día 28. En los dos grupos de control, se encontraron muertos o se practicó la eutanasia de 15 animales (7/9 en el grupo de IgG policlonal humana y 8/10 en el grupo de solución salina tampón fosfato) debido a que estaban muy debilitados (> 30 % de pérdida de peso corporal).
60 La media de tiempo de supervivencia en ambos grupos de control era de 20 días.

Las curvas de supervivencia de los dos grupos de control y los grupos de progresión con el anticuerpo Ab1 (dosificados desde el día 1 del estudio) se presentan en la Figura 5.

5 Las curvas de supervivencia de los dos grupos de control y los grupos de regresión con el anticuerpo Ab1 (dosificados desde el día 8 del estudio) se presentan en la Figura 6.

10 Había una diferencia estadísticamente significativa entre las curvas de supervivencia de los grupos de control con IgG policlonal humana ($p = 0,0038$) y solución salina tampón fosfato ($p = 0,0003$) y la curva de supervivencia de los seis grupos con el anticuerpo Ab1. No había diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos de control ($p = 0,97$).

Resultados – Seroamiloide A plasmático

15 La media (\pm SEM) de concentración de seroamiloide A plasmático frente al tiempo en los dos grupos de control y los grupos de progresión con anticuerpo Ab1 (dosificados desde el día 1 del estudio) y de regresión (dosificados desde el día 8 del estudio) se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Media de SAA plasmático – todos los grupos con anticuerpo Ab1 frente a grupos de control

	Media de SAA plasmático \pm SEM Día 5 (μ g/ml)	Media de SAA plasmático \pm SEM Día 13 (μ g/ml)	Media de SAA plasmático \pm SEM Extracción final (μ g/ml)
IgG policlonal iv semanalmente desde el día 1	675 \pm 240 (n=5)	3198 \pm 628 (n=4)	13371 \pm 2413 (n=4)
PBS iv semanalmente desde el día 1	355 \pm 207 (n=5)	4844 \pm 1126 (n=5)	15826 \pm 802(n=3)
Ab1 a 30 mg/kg iv semanalmente desde el día 1	246 \pm 100 (n=5)	2979 \pm 170 (n=5)	841 \pm 469 (n=10)
Ab1 a 10 mg/kg iv semanalmente desde el día 1	3629 \pm 624 (n=5)	3096 \pm 690(n=5)	996 \pm 348 (n=10)
Ab1 a 3 mg/kg iv semanalmente desde el día 1	106 \pm 9 (n=5)	1623 \pm 595 (n=4)	435 \pm 70 (n=9)
Ab1 a 30 mg/kg iv semanalmente desde el día 8	375 \pm 177 (n=5)	1492 \pm 418 (n=4)	498 \pm 83 (n=9)
Ab1 a 10 mg/kg iv semanalmente desde el día 8	487 \pm 170 (n=5)	1403 \pm 187 (n=5)	396 \pm 58 (n=10)
Ab1 a 3 mg/kg iv semanalmente desde el día 8	1255 \pm 516 (n=5)	466 \pm 157 (n=5)	685 \pm 350 (n=5)

20 El SAA está regulado positivamente por medio de la estimulación de hIL-6 y esta respuesta se correlaciona directamente con los niveles circulatorios de hIL-6 derivados del tumor implantado. El marcador suplente proporciona una lectura indirecta de la hIL-6 activa. Por lo tanto, en los dos grupos de tratamiento descritos anteriormente tienen una disminución significativa de los niveles de SAA debido a la neutralización de la hIL-6 derivad del tumor. Esto apoya adicionalmente la opinión de que el anticuerpo Ab1 presenta una eficacia in vivo.

Ejemplo 11 Estudio 2 del modelo de caquexia con RFX393

Introducción

30 Se llevó a cabo un segundo estudio en el modelo de caquexia RFX393 en el que el tratamiento con el Ab1 comenzaba en un estadio más tardío (días 10 y 13 post-trasplante) y con una fase de tratamiento más prolongada (hasta 49 días post-trasplante). El intervalo de dosificación con el anticuerpo Ab1 ese acortó a 3 días de los 7 y se midió también el consumo diario de alimento. Se hizo un intento también de referenciar el tamaño de los tumores en el momento de inicio de la dosificación con el anticuerpo Ab1.

Métodos

Se implantaron en ochenta ratones desnudos atímicos machos de 6 semanas de edad fragmentos tumorales de

- RFX393 (30-40 mg) por vía subcutánea en el costado derecho. Se seleccionaron 20 ratones en los que los tumores habían alcanzado entre 270-320 mg de tamaño y se dividieron en dos grupos. Un grupo recibió el anticuerpo Ab1 a 10 mg/kg i.v. cada tres días y el otro grupo recibió IgG policlonal humana a 10 mg/kg cada 3 días desde el punto de tiempo (el día 10 tras el trasplante). Otros 20 ratones se seleccionaron cuando el tamaño de sus tumores alcanzaba 400-527 mg de tamaño y se dividieron en dos grupos. Un grupo recibió anticuerpo Ab1 a 10 mg/kg i.v. cada tres días y el otro grupo recibió IgG policlonal humana a 10 mg/kg cada 3 días desde ese punto de tiempo (día 13 tras el trasplante). Los 40 ratones restantes no tomaron parte más en el estudio y se les practicó la eutanasia el día 49, cuando el tumor alcanzaba los 4.000 mm³ o si estaban muy debilitados (> 30 % de pérdida de peso corporal).
- Los animales se pesaron cada 3-4 días desde el día 1 al día 49 tras el trasplante. Se utilizó el porcentaje medio de peso corporal (MPBW) como parámetro primario para controlar la pérdida de peso durante el estudio. Este se calculaba de la siguiente manera: $((\text{peso corporal} - \text{peso tumoral}) / \text{línea basal de peso corporal}) \times 100$. El peso tumoral se midió cada 3-4 días desde el día 5 al día 49 tras el trasplante. Se midió el consumo de alimento (cantidad consumida en 24 horas por peso (g) por cada grupo de tratamiento) cada día desde el día 10 para los grupos de tumor de 270-320 mg y el día 13 para los grupos con tumores de 400-527 mg.

Resultados – supervivencia

- Las curvas de supervivencia con el anticuerpo Ab1 a 10 mg/kg i.v. cada tres días (tamaño tumoral 270-320 mg) y con la IgG policlonal humana a 10 mg/kg i.v. cada tres días (tamaño tumoral 270-320 mg) se presentan en la Figura 7.

- La supervivencia media con el anticuerpo Ab1 a 10 mg/kg i.v. cada tres días (tamaño tumoral 270-320 mg) era de 46 días y con la IgG policlonal humana a 10 mg/kg i.v. cada tres días (tamaño tumoral 270-320 mg) era de 32,5 días ($p = 0,0071$).

- Las curvas de supervivencia con el anticuerpo Ab1 a 10 mg/kg i.v. cada tres días (tamaño tumoral 400-527 mg) y con la IgG policlonal humana a 10 mg/kg i.v. cada tres días (tamaño tumoral 400-527 mg) se presentan en la Figura 8. La supervivencia media para el anticuerpo Ab1 a 10 mg/kg i.v. cada tres días (tamaño tumoral 400-527 mg) era de 46,5 días y con la IgG policlonal humana a 10 mg/kg i.v. cada tres días (tamaño tumoral 400-527 mg) era de 27 días ($p = 0,0481$).

Ejemplo 12 Evaluación farmacocinética multi-dosis de anticuerpo Ab1 en primates no humanos

- Se dosificó el anticuerpo Ab1 en una infusión en embolada única a un único macho y una única hembra de mono *Cynomolgus* en solución salina tampón fosfato. Se extrajeron muestras de plasma en los intervalos de tiempo fijados y se cuantificó el nivel de anticuerpo Ab1 por medio del uso de un ensayo ELISA de captura antigénica. Se capturó IL-6 biotinilada (50 µl de 3 µg/ml) en placas de microtitulación de 96 pocillos revestidos con estreptavidina. Las placas se lavaron y se bloquearon con un 0,5 % de gelatina de pescado. Se añadieron las muestras de plasma diluidas apropiadamente y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se retiraron y se aplicó un anticuerpo secundario anti-hFc conjugado con HRP y se dejó a temperatura ambiente.

- Las placas se aspiraron entonces y se añadió TMB para visualizar la cantidad de anticuerpo. Entonces se determinaron los niveles específicos mediante el uso de una curva de referencia. Una segunda dosis de anticuerpo Ab1 se administró el día 35 a los mismos dos monos *Cynomolgus* y se replicó el experimento utilizando un plan de muestreo idéntico. Las concentraciones resultantes se representaron entonces frente al tiempo como se muestra en la Figura 9.

- Este anticuerpo aglucosilado humanizado de longitud completa purificado que se expresaba en *Pichia pastoris* presenta características comparables a la proteína que se expresa en mamíferos. Además, las múltiples dosis de este producto presentan semividas reproducibles lo que sugiere que esta plataforma de producción no genera productos que presenten un aumento de inmunogenicidad.

Ejemplo 13 Caracterización mecánica en Octet de los anticuerpos proteicos

- La señalización de IL-6 depende de las interacciones entre la IL-6 y dos receptores, IL-6R1 (CD126) y GP130 (transductor de la señal de IL-6). Para determinar el mecanismo de acción del anticuerpo, se llevaron a cabo estudios mecánicos utilizando interferometría de capa con un instrumento Octet QK (ForteBio; Menlo Park, CA). Los estudios se llevaron a cabo con dos configuraciones diferentes. En la primera orientación, se unía una IL-6 biotinilada (R&D Systems número de parte 206-IL-001MG/CF, biotinilada utilizando la EZ link Pierce de sulfo-NHS-LC-LC-biotina número de producto 21338 de acuerdo con los protocolos del fabricante) inicialmente a un biosensor revestido de estreptavidina (ForteBio número de parte 18-5006). La unión se comprobó como un aumento de señal.

- La unión de IL-6 al sensor se incubó entonces con el anticuerpo en cuestión o una solución con solo el diluyente. El sensor se incubó entonces con la molécula de IL-6R1 soluble (R&D systems numero de producto 227-SR-025/CF). Si la molécula del IL-6R1 no se unía, se consideraba que el anticuerpo bloqueaba las interacciones IL-6/IL-6R1.

Estos complejos se incubaron con GP130 (R&D systems 228-GP-010/CF) en presencia de IL-6R1 con fines de estabilidad. Si GP130 no se unía, se concluía que el anticuerpo bloqueaba las interacciones de GP130 con IL-6.

5 En la segunda orientación, el anticuerpo se unía a un biosensor revestido con un reactivo específico de Fc anti-IgG1 humana (ForteBio número de parte 18-5001). La IL-6 se unía al anticuerpo inmovilizado y el sensor se incubaba con IL-6R1. Si el IL-6R1 no interactuaba con la IL-6, entonces se concluía que el anticuerpo de unión a IL-6 bloqueaba las interacciones IL-6/IL-6R1. En estas situaciones cuando se observaba el complejo anticuerpo/IL-6/IL-6R1, se incubaba con GP130 en presencia de IL-6R1. Si GP130 no interactuaba, entonces se concluía que el anticuerpo bloqueaba las interacciones IL-6/GP130. Todos los estudios se llevaron a cabo en un volumen final de 200 µl, a 30 °C y 1000 rpm. Para estos estudios, todas las proteínas se diluyeron utilizando el tampón de dilución de muestras de ForteBio (número de parte 18-5028).

Los resultados se presentan en las Figuras 10A-E y 11.

15 **Ejemplo 14 Mapeo peptídico**

Con el fin de determinar el epítipo reconocido por Ab1 en la IL-6 humana, se empleó el anticuerpo en un ensayo basado en la transferencia de western. La forma de IL-6 humana que se utilizó en este ejemplo tenía una secuencia de 183 aminoácidos de longitud (que se muestra posteriormente). Se sintetizó comercialmente una biblioteca de 57 miembros de péptidos que solapaban 15 aminoácidos que engloban esta secuencia y se unió covalentemente a una membrana de nitrocelulosa PepSpots (JPT Peptide technologies, Berlin, Alemania). Las secuencias de los 15 aminoácidos solapados se muestran en la Figura 12. Las transferencias se prepararon y sondearon según las recomendaciones del fabricante.

25 En resumen, se pre-humectaron las transferencias en metanol, se aclararon con PBS, y se bloquearon durante 2 horas con leche desnatada al 10 % en PBS/0,05 % Tween (solución de bloqueo). El anticuerpo Ab1 se utilizó con una dilución final de 1 mg/ml, y se utilizó un anticuerpo secundario de ratón anti-kappa humana (Southern BioTech nº 9220-05) con una dilución de 1:5000. Se llevaron a cabo las diluciones/incubaciones de anticuerpo en la solución de bloqueo. Se llevaron a cabo las transferencias utilizando los reactivos Amersham ECL advance (GE nº RPN2135) y se documentó la señal quimioluminiscente utilizando una cámara CCD (AlphaInnotech). Los resultados de las transferencias se muestran en las Figuras 13 y 14

Se expone la secuencia de la forma de IL-6 humana utilizada para generar la biblioteca de péptidos.

VPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRKETCNKSNMCESSKEALA
 ENNLNLPKMAEKDGCFCQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFFESSEEQARA
 VQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSF
 35 KEFLQSSLRALRQM (SEQ ID NO: 1).

LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> Garcia, Leon Jensen, Anne E.C. Olson, Katie Dutzar, Ben Ojala, Ethan Kovacevich, Brian Latham, John Smith, Jeffrey T.L.

<120> ANTICUERPOS CONTRA IL-6

45 <130> 67858.701802

<150> 60/924.550

<151> 21-05-2007

50 <160> 646

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 183

55 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 610 607 T3

Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln
 1 5 10 15

Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu
 20 25 30

Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met
 35 40 45

Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro
 50 55 60

Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu
 65 70 75 80

Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr
 85 90 95

Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg
 100 105 110

Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys
 115 120 125

Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala
 130 135 140

Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met
 145 150 155 160

Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met
 180

<210> 2
 <211> 122
 5 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 2

ES 2 610 607 T3

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
 20 25 30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
 35 40 45

Gln Ser Ile Asn Asn Glu Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 50 55 60

Arg Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
 65 70 75 80

Ser Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Gly Tyr Ser Leu Arg Asn Ile Asp Asn Ala
 115 120

<210> 3
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

5

<400> 3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

10

ES 2 610 607 T3

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 35 40 45

Asn Tyr Tyr Val Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Gly Ser Asp Glu Thr Ala Tyr Ala Thr Trp
 65 70 75 80

Ala Ile Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu
 85 90 95

Lys Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 100 105 110

Arg Asp Asp Ser Ser Asp Trp Asp Ala Lys Phe Asn Leu
 115 120 125

5 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 4

10 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Glu Leu Ser
 1 5 10

15 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 5

20 Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 6

30 Gln Gln Gly Tyr Ser Leu Arg Asn Ile Asp Asn Ala
 1 5 10

<210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

ES 2 610 607 T3

<400> 7

Asn Tyr Tyr Val Thr
1 5

5 <210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 8

Ile Ile Tyr Gly Ser Asp Glu Thr Ala Tyr Ala Thr Trp Ala Ile Gly
1 5 10 15

15 <210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 9

Asp Asp Ser Ser Asp Trp Asp Ala Lys Phe Asn Leu
1 5 10

25 <210> 10
<211> 366
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 10

atggacacga	gggccccac	tcagctgctg	gggtcctgc	tgctctggct	cccaggtgcc	60
agatgtgctt	atgatatgac	ccagactcca	gcctoggtgt	ctgcagctgt	gggaggcaca	120
gtcaccatca	agtgccaggc	cagtcagagc	attaacaatg	aattatcctg	gtatcagcag	180
aaaccagggc	agcgtcccaa	gctcctgata	tatagggcat	ccactctggc	atctggggtc	240
tcctcgcggt	tcaaaggcag	tggatctggg	acagagttca	ctctcaccat	cagcgacctg	300
gagtggtccg	atgctgccac	ttactactgt	caacaggggt	atagtctgag	gaatattgat	360
aatgct						366

30 <210> 11
<211> 375
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 11

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
 tcgctggagg agtccggggg tcgcctggtc acgcctggga caccctgac actcacctgc 120
 acagcctctg gattctccct cagtaactac tacgtgacct gggtcgccca ggctccaggg 180
 aaggggctgg aatggatcgg aatcatttat ggtagtgatg aaacggccta cgcgacctgg 240
 gcgataggcc gattcaccat ctccaaaacc tcgaccacgg tggatctgaa aatgaccagt 300
 ctgacagccg cggacacggc cacctatttc tgtgccagag atgatagtag tgactgggat 360
 gcaaaattta acttg 375

5 <210> 12
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 12
 caggccagtc agagcattaa caatgaatta tcc 33

15 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 13
 agggcatcca ctctggcatc t 21

25 <210> 14
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 14
 caacagggft atagtctgag gaatattgat aatgct 36

35 <210> 15
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 15
 aactactacg tgacc 15

45 <210> 16
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 16
 atcatttatg gtagtgatga aacggcctac gcgacctggg cgataggg 48

55 <210> 17
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

60 <400> 17
 gatgatagta gtgactggga tgcaaaattt aacttg 36

65 <210> 18
 <211> 109

ES 2 610 607 T3

<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 18

5

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

<210> 19
<211> 109
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

10

<400> 19

ES 2 610 607 T3

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

<210> 20
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

5

<400> 20

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

10

<210> 21

ES 2 610 607 T3

<211> 122
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

5 <400> 21

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
          20          25          30

Val Glu Val Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser
          35          40          45

Glu Thr Ile Tyr Ser Trp Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
          50          55          60

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Asp Leu Ala Ser Gly Val
65          70          75          80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr
          85          90          95

Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
          100          105          110

Gly Tyr Ser Gly Ser Asn Val Asp Asn Val
          115          120
    
```

10 <210> 22
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

15 <400> 22

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

Pro Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

Asn Asp His Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Tyr Ile Gly Phe Ile Asn Ser Gly Gly Ser Ala Arg Tyr Ala Ser
65 70 75 80

Trp Ala Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp
85 90 95

Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
100 105 110

Val Arg Gly Gly Ala Val Trp Ser Ile His Ser Phe Asp Pro
115 120 125

<210> 23
<211> 11
5 <212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 23

Gln Ala Ser Glu Thr Ile Tyr Ser Trp Leu Ser
1 5 10

10

<210> 24
<211> 7
15 <212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 24

Gln Ala Ser Asp Leu Ala Ser
1 5

20

<210> 25
<211> 12
<212> PRT
25 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 25

Gln Gln Gly Tyr Ser Gly Ser Asn Val Asp Asn Val
1 5 10

ES 2 610 607 T3

5 <210> 26
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 26

Asp His Ala Met Gly
 1 5

10 <210> 27
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 15 <400> 27

Phe Ile Asn Ser Gly Gly Ser Ala Arg Tyr Ala Ser Trp Ala Glu Gly
 1 5 10 15

20 <210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 28

Gly Gly Ala Val Trp Ser Ile His Ser Phe Asp Pro
 1 5 10

30 <210> 29
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 29

atggacaoga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 agatgtgcot atgatatgac ccagactcca gcctctgtgg aggtagctgt gggaggcaca 120
 gtcaccatca attgccaggc cagtgagacc atttacagtt ggttatcctg gtatcagcag 180
 aagccagggc agcctcccaa gctcctgatc taccagggat ccgatctggc atctggggtc 240
 ccatcgcgat tcagcggcag tggggctggg acagagtaca ctctcaccat cagcggcgtg 300
 cagtgtgacg atgctgccac ttactactgt caacagggtt atagtggtag taatgttgat 360
 aatggt 366

35 <210> 30
 <211> 378
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 40 <400> 30

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
gagcagctga aggagtccgg gggctgcctg gtcacgcctg ggacaccct gacacttacc 120
tgcacagcct ctggattctc cctcaatgac catgcaatgg gctgggtccg ccaggctcca 180
gggaaggggc tggatacat cggattcatt aatagtggtg gtagcgcacg ctacgcgagc 240
tgggcagaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cgggtgatct gaaaatgacc 300
agtctgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgtca gagggggtgc tgtttgaggt 360
attcatagtt ttgatccc 378

5 <210> 31
<211> 33
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 31
caggccagtg agaccattta cagttggta tcc 33

15 <210> 32
<211> 21
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 32
caggcatccg atctggcatc t 21

25 <210> 33
<211> 36
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 33
caacagggtt atagtggtag taatgttgat aatgtt 36

35 <210> 34
<211> 15
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 34
gacatgcaa tgggc 15

45 <210> 35
<211> 48
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 35
ttcattaata gtgggtggtag cgcacgctac gcgagctggg cagaaggc 48

55 <210> 36
<211> 36
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

60 <400> 36
gggggtgctg ttggagat tcatagtttt gatccc 36

65 <210> 37
<211> 123
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

ES 2 610 607 T3

<400> 37

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro
          20          25          30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys Gln Ala Ser
          35          40          45

Gln Ser Val Tyr Asp Asn Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro
          50          55          60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser
65          70          75          80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Val Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
          85          90          95

Leu Thr Ile Thr Asp Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
          100          105          110

Ala Gly Val Tyr Asp Asp Asp Ser Asp Asn Ala
          115          120

```

5

<210> 38
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10

<400> 38

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 35 40 45

Val Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Ile Gly Phe Ile Thr Met Ser Asp Asn Ile Asn Tyr Ala Ser Trp
 65 70 75 80

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu
 85 90 95

Lys Met Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 100 105 110

Arg Ser Arg Gly Trp Gly Thr Met Gly Arg Leu Asp Leu
 115 120 125

<210> 39
 <211> 13
 5 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 39

Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Asp Asn Asn Tyr Leu Ser
 1 5 10

10
 15 <210> 40
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 40

Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

20
 25 <210> 41
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 41

Ala Gly Val Tyr Asp Asp Asp Ser Asp Asn Ala
 1 5 10

ES 2 610 607 T3

5 <210> 42
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 42

Val Tyr Tyr Met Asn
 1 5

10 <210> 43
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 15 <400> 43

Phe Ile Thr Met Ser Asp Asn Ile Asn Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

20 <210> 44
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 44

Ser Arg Gly Trp Gly Thr Met Gly Arg Leu Asp Leu
 1 5 10

30 <210> 45
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 45

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct ccaggtgcc 60
 acatttgccg ccgtgctgac ccagactcca tctcccgtgt ctgcagctgt gggaggcaca 120
 gtcagcatca gttgccaggc cagtcagagt gtttatgaca acaactactt atcctggttt 180
 cagcagaaac cagggcagcc tcccaagctc ctgatctatg gtgcatccac tctggcatct 240
 ggggtcccat cgcggttcgt gggcagtgga tctgggacac agttcactct caccatcaca 300
 gacgtgcagt gtgacgatgc tgccacttac tattgtgcag gcgtttatga tgatgatagt 360
 35 gataatgcc 369

40 <210> 46
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 46

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtggctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
 tcgctggagg agtccggggg tcgcctggtc acccctggga caccctgac actcacctgc 120
 acagcctctg gattctccct cagtgtctac tacatgaact gggtcgccca ggctccaggg 180
 aaggggctgg aatggatcgg attcattaca atgagtgata atataaatta cgcgagctgg 240
 gcgaaaggcc gattcaccat ctccaaaacc tcgaccacgg tggatctgaa aatgaccagt 300
 ccgacaaccg aggacacggc cacctatttc tgtgccagga gtcgtggctg gggtagaatg 360
 ggtcgggttg atctc 375

5 <210> 47
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 47
 caggccagtc agagtgttta tgacaacaac tacttatcc 39

15 <210> 48
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 48
 ggtgcatcca ctctggcatc t 21

25 <210> 49
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 49
 gcaggcgttt atgatgatga tagtgataat gcc 33

35 <210> 50
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 50
 gtctactaca tgaac 15

45 <210> 51
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 51
 ttcattacaa tgagtgataa tataaattac gcgagctggg cgaaaggc 48

55 <210> 52
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

60 <400> 52
 agtctggct ggggtacaat ggtcgggtg gatctc 36

65 <210> 53
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

ES 2 610 607 T3

<400> 53

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

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

Val Ser Ala Pro Val Gly Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys Gln Ala Ser
 35 40 45

Gln Ser Val Tyr Glu Asn Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Asp Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
 85 90 95

Leu Thr Ile Thr Asp Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Ala Gly Val Tyr Asp Asp Asp Ser Asp Asp Ala
 115 120

5

<210> 54
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10

<400> 54

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Glu Gln Leu Lys Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Thr
 20 25 30

Pro Gly Gly Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Asn Ala Tyr Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Phe Ile Thr Leu Asn Asn Asn Val Ala Tyr Ala Asn
 65 70 75 80

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp
 85 90 95

Leu Lys Met Thr Ser Pro Thr Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 100 105 110

Ala Arg Ser Arg Gly Trp Gly Ala Met Gly Arg Leu Asp Leu
 115 120 125

<210> 55
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

5

<400> 55

Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Glu Asn Asn Tyr Leu Ser
 1 5 10

10

<210> 56
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

15

<400> 56

Gly Ala Ser Thr Leu Asp Ser
 1 5

20

<210> 57
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

25

<400> 57

Ala Gly Val Tyr Asp Asp Asp Ser Asp Asp Ala
 1 5 10

ES 2 610 607 T3

5 <210> 58
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 58

Ala Tyr Tyr Met Asn
 1 5

10 <210> 59
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 15 <400> 59

Phe Ile Thr Leu Asn Asn Val Ala Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

20 <210> 60
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 60

Ser Arg Gly Trp Gly Ala Met Gly Arg Leu Asp Leu
 1 5 10

30 <210> 61
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 61

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 atatgtgacc ctgtgctgac ccagactcca tctcccgtat ctgcacctgt gggaggcaca 120
 gtcagcatca gttgccaggc cagtcagagt gtttatgaga acaactattt atcctggttt 180
 cagcagaaac cagggcagcc tcccaagctc ctgatctatg gtgcatccac tctggattct 240
 ggggtcccat cgcggttcaa aggcagtgga tctgggacac agttcactct caccattaca 300
 gacgtgcagt gtgacgatgc tgccacttac tattgtgcag gcgtttatga tgatgatagt 360
 gatgatgcc 369

35 <210> 62
 <211> 378
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 40 <400> 62

ES 2 610 607 T3

atgggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtggctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
gagcagctga aggagtccgg aggaggcctg gtaacgcctg gaggaaccct gacactcacc 120
tgcacagcct ctggattctc cctcaatgcc tactacatga actgggtccg ccaggctcca 180
gggaaggggc tggaatggat cggattcatt actctgaata ataatgtagc ttacgcgaac 240
tgggcgaaag gccgattcac cttctccaaa acctcgacca cggtgatct gaaaatgacc 300
agtcgcgacac ccgaggacac ggccacctat ttctgtgccg ggagtcgtgg ctgggggtgca 360
atgggtcggg tggatctc 378

5 <210> 63
<211> 39
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 63
caggccagtc agagtgtta tgagaacaac tatttatcc 39

15 <210> 64
<211> 21
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 64
ggtgcatcca ctctggattc t 21

25 <210> 65
<211> 33
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 65
gcaggcggtt atgatgatga tagtgatgat gcc 33

35 <210> 66
<211> 15
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 66
gcctactaca tgaac 15

45 <210> 67
<211> 48
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 67
ttcattactc tgaataataa tgtagcttac gcgaactggg cgaaaggc 48

55 <210> 68
<211> 36
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

60 <400> 68
agtcgtggct ggggtgcaat gggtcggtg gatctc 36

65 <210> 69
<211> 122
<212> PRT

ES 2 610 607 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 69

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro
20          25          30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser
35          40          45

Gln Ser Val Asp Asp Asn Asn Trp Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Arg
50          55          60

Gly Gln Pro Pro Lys Tyr Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
65          70          75

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
85          90          95

Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100         105         110

Ala Gly Gly Phe Ser Gly Asn Ile Phe Ala
115          120

```

5

<210> 70

<211> 122

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 70

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 35 40 45

Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Ile Gly Ile Ile Gly Gly Phe Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp
 65 70 75 80

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu
 85 90 95

Arg Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 100 105 110

Arg Gly Gly Pro Gly Asn Gly Gly Asp Ile
 115 120

5 <210> 71
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 71

10 Gln Ala Ser Gln Ser Val Asp Asp Asn Asn Trp Leu Gly
 1 5 10

15 <210> 72
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 72

20 Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 73
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 73

ES 2 610 607 T3

Ala Gly Gly Phe Ser Gly Asn Ile Phe Ala
 1 5 10

5 <210> 74
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 74

Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

10 <210> 75
 <211> 16
 <212> PRT
 15 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 75

Ile Ile Gly Gly Phe Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

20 <210> 76
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 76

Gly Gly Pro Gly Asn Gly Gly Asp Ile
 1 5

30 <210> 77
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 35 <400> 77

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 acatttgccc aagtgctgac ccagactcca tcgcctgtgt ctgcagctgt gggaggcaca 120
 gtcaccatca actgccaggc cagtcagagt gttgatgata acaactggtt aggctggtat 180
 cagcagaaac gagggcagcc tcccaagtac ctgatctatt ctgcatccac tctggcatct 240
 ggggtcccat cgcggttcaa aggcagtgga tctgggacac agttcactct caccatcagc 300
 gacctggagt gtgacgatgc tgccacttac tactgtgcag gcggttttag tggtaatatc 360
 tttgct 366

40 <210> 78
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 45 <400> 78

ES 2 610 607 T3

	atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag	60
	tcggtggagg agtccggggg tcgctgtgac acgcctggga caccctgac actcacctgc	120
	acagtctctg gcttctccct cagtagctat gcaatgagct gggcccgcca ggctccagga	180
	aaggggctgg agtggatcgg aatcattggg ggttttggtg ccacatacta cgcgacctgg	240
	gcgaaaggcc gattcaccat ctccaaaacc tcgaccacgg tggatctgag aatcaccagt	300
	ccgacaaccg aggacacggc cacctatttc tgtgccagag gtggtcctgg taatgggtgt	360
	gacatc	366
5	<210> 79 <211> 39 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
10	<400> 79 cagccagtc agagtgtga tgataacaac tggtaggc	39
15	<210> 80 <211> 21 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	<400> 80 tctgcatcca ctctggcatc t	21
20	<210> 81 <211> 30 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
25	<400> 81 gcaggcgggt ttagtgtaa tatcttgct	30
30	<210> 82 <211> 15 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	<400> 82 agctatgcaa tgagc	15
35	<210> 83 <211> 48 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
40	<400> 83 atcattggg gtttggtac cacatactac gcgacctggg cgaaaggc	48
45	<210> 84 <211> 27 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
50	<400> 84 ggtggtcctg gtaatggtg tgacatc	27
	<210> 85 <211> 122 <212> PRT	

ES 2 610 607 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 85

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro
          20          25          30

Val Ser Val Pro Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ser Ser
          35          40          45

Gln Ser Val Tyr Asn Asn Phe Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 50          55          60

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly
65          70          75          80

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu
          85          90          95

Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu
          100          105          110

Gly Gly Tyr Asp Asp Asp Ala Asp Asn Ala
          115          120

```

5

<210> 86

<211> 128

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 86

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser
 35 40 45

Asp Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Ala Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser
 65 70 75 80

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp
 85 90 95

Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 100 105 110

Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Asp Tyr Gly Asp Phe Asp Arg Leu Asp Leu
 115 120 125

5 <210> 87
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 87

10 Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Phe Leu Ser
 1 5 10

15 <210> 88
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 88

20 Gln Ala Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 89
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 89

ES 2 610 607 T3

Leu Gly Gly Tyr Asp Asp Asp Ala Asp Asn Ala
 1 5 10

5 <210> 90
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 90

10 Asp Tyr Ala Met Ser
 1 5

15 <210> 91
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 91

Ile Ile Tyr Ala Gly Ser Gly Ser Thr Trp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys

1 5 10 15

20 Gly
 <210> 92
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 92

Asp Gly Tyr Asp Asp Tyr Gly Asp Phe Asp Arg Leu Asp Leu
 1 5 10

30 <210> 93
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 35 <400> 93

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 acatttgcag ccgtgctgac ccagacacca tcgccctgt ctgtacctgt gggaggcaca 120
 gtcaccatca agtgccagtc cagtcagagt gtttataata atttcttacc gtggtatcag 180
 cagaaaccag ggcagcctcc caagctcctg atctaccagg catccaaact ggcacatctggg 240
 gtcccagata ggttcagcgg cagtgatctt gggacacagt tcactctcac catcagcggc 300
 gtgcagtgctg acgatgctgc cacttactac tgtctaggcg gttatgatga tgatgctgat 360
 aatgct 366

40 <210> 94
 <211> 384
 <212> ADN

ES 2 610 607 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 94

	atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag	60
	tcggtggagg agtccggggg tgcctggtc acgcctggga caccctgac gtcacctgc	120
	acagtctctg gaatcgacct cagtgactat gcaatgagct gggcccgcca ggctccaggg	180
	aaggggctgg aatggatcgg aatcatttat gctggtagtg gtagcaatg gtacgagagc	240
	tgggcgaaaag gccgattcac catctccaaa acctcgacca cggtaggatct gaaaatcacc	300
	agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gagatggata cgatgactat	360
5	ggtgatttcg atcgattgga tctc	384

<210> 95

<211> 36

<212> ADN

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 95

cagtcagtc agagtgtta taataattc ttatcg 36

15 <210> 96

<211> 21

<212> ADN

<213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 96

caggcatcca aactggcatc t 21

<210> 97

<211> 33

25 <212> ADN

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 97

ctaggcggtt atgatgatga tgctgataat gct 33

30 <210> 98

<211> 15

<212> ADN

<213> *Oryctolagus cuniculus*

35 <400> 98

gactatgcaa tgagc 15

<210> 99

<211> 51

<212> ADN

<213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 99

atcatttatg ctggtagtgg tagcacatgg tacgcgagct gggcgaagg c 51

<210> 100

<211> 42

<212> ADN

50 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 100

gatggatagc atgactatgg tgatttcgat cgattggatc tc 42

ES 2 610 607 T3

<210> 101
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

5

<400> 101

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
 20 25 30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
 35 40 45

Gln Ser Ile Asn Asn Glu Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln
 50 55 60

Arg Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
 65 70 75 80

Ser Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Gly Tyr Ser Leu Arg Asn Ile Asp Asn Ala
 115 120

10

<210> 102
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

15

<400> 102

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Ser Gly
 1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 35 40 45

Asn Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Ile Gly Met Ile Tyr Gly Ser Asp Glu Thr Ala Tyr Ala Asn Trp
 65 70 75 80

Ala Ile Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu
 85 90 95

Lys Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 100 105 110

Arg Asp Asp Ser Ser Asp Trp Asp Ala Lys Phe Asn Leu

115

120

125

<210> 103
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 103

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Glu Leu Ser
 1 5 10

10

<210> 104
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 104

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

20

<210> 105
 <211> 12
 <212> PRT
 25 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 105

ES 2 610 607 T3

Gln Gln Gly Tyr Ser Leu Arg Asn Ile Asp Asn Ala
 1 5 10

5 <210> 106
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 106

Asn Tyr Tyr Met Thr
 1 5

10
 15 <210> 107
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 107

Met Ile Tyr Gly Ser Asp Glu Thr Ala Tyr Ala Asn Trp Ala Ile Gly
 1 5 10 15

20 <210> 108
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 108

Asp Asp Ser Ser Asp Trp Asp Ala Lys Phe Asn Leu
 1 5 10

30 <210> 109
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 35 <400> 109

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgetctggct cccaggtgcc 60
 agatgtgcct atgatatgac ccagactcca gcctcgggtg ctgcagctgt gggaggcaca 120
 gtcacatca aatgccaggc cagtcagagc attaacaatg aattatcctg gtatcagcag 180
 aaatcagggc agcgtcccaa gctcctgata tatagggcat ccaactctggc atctggggtc 240
 tcatcggcgt tcaaaggcag tggatctggg acagagttca ctctcaccat cagcgacctg 300
 gagtgtgccg atgctgccac ttactactgt caacagggtt atagtctgag gaatattgat 360
 aatgct 366

40 <210> 110
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 45 <400> 110

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tctcaggtgt ccagtgtcag 60
 tcgctggagg agtccggggg tcgcctggtc acgcctggga caccctgac actcacctgc 120
 acagcctctg gattctccct cagtaactac tacatgacct ggggccgcca ggctccaggg 180
 aaggggctgg aatggatcgg aatgatttat ggtagtgatg aaacagccta cgcgaactgg 240
 gcgataggcc gattcaccat ctccaaaacc tcgaccacgg tggatctgaa aatgaccagt 300
 ctgacagccg cggacacggc cacctatttc tgtgccagag atgatagtag tgactgggat 360
 gcaaaattta acttg 375

5 <210> 111
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 111
 caggccagtc agagcattaa caatgaatta tcc 33

15 <210> 112
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 112
 agggcatcca ctctggcatc t 21

25 <210> 113
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 113
 caacagggtt atagtctgag gaatattgat aatgct 36

35 <210> 114
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 114
 aactactaca tgacc 15

45 <210> 115
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 115
 atgatttatg gtagtgatga aacagcctac gcgaactggg cgataggg 48

55 <210> 116
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

60 <400> 116
 gatgatagta gtgactggga tgcaaaattt aacttg 36

65 <210> 117
 <211> 109
 <212> PRT

ES 2 610 607 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 117

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

5

<210> 118

<211> 109

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 118

ES 2 610 607 T3

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

<210> 119
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

5

<400> 119

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

10

<210> 120

ES 2 610 607 T3

<211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

5 <400> 120

Ile Ile Tyr Gly Ser Asp Glu Thr Ala Tyr Ala Thr Ser Ala Ile Gly
 1 5 10 15

10 <210> 121
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

15 <400> 121

Met Ile Tyr Gly Ser Asp Glu Thr Ala Tyr Ala Asn Ser Ala Ile Gly
 1 5 10 15

20 <210> 122
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 122

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro
 20 25 30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser
 35 40 45

Gln Ser Val Gly Asn Asn Gln Asp Leu Ser Trp Phe Gln Gln Arg Pro
 50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Glu Ile Ser Lys Leu Glu Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr
 85 90 95

Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110

25 Leu Gly Gly Tyr Asp Asp Asp Ala Asp Asn Ala
 115 120

30 <210> 123
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

ES 2 610 607 T3

<400> 123

```

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1                               10                      15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
          35                          40                      45

Ser Arg Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
          50                          55                      60

Trp Ile Gly Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp
65                          70                          75                      80

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu
          85                          90                      95

Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
          100                         105                      110

Arg Leu Gly Asp Thr Gly Gly His Ala Tyr Ala Thr Arg Leu Asn Leu
          115                         120                      125
    
```

5 <210> 124
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 124

Gln Ser Ser Gln Ser Val Gly Asn Asn Gln Asp Leu Ser

1 5 10

15 <210> 125
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 125

Glu Ile Ser Lys Leu Glu Ser
 1 5

25 <210> 126
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 126

ES 2 610 607 T3

Leu Gly Gly Tyr Asp Asp Asp Ala Asp Asn Ala
 1 5 10

5 <210> 127
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 127

Ser Arg Thr Met Ser
 1 5

15 <210> 128
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 128

20 Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

25 <210> 129
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 129

Leu Gly Asp Thr Gly Gly His Ala Tyr Ala Thr Arg Leu Asn Leu
 1 5 10 15

30 <210> 130
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

35 <400> 130

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 acatttgac ccgctgctgac ccagacacca tcaccogtgt ctgcagctgt gggaggcaca 120
 gtcaccatca gttgccagtc cagtcagagt gttgtaata accaggactt atcctggttt 180
 cagcagagac cagggcagcc tcccaagctc ctgatctacg aaatatcaa actggaatct 240
 ggggtcccat cgcggttcag cggcagtgga tctgggacac acttcactct caccatcagc 300
 ggcgtacagt gtgacgatgc tgccacttac tactgtctag gcggttatga tgatgatgct 360
 gataatgct 369

40 <210> 131
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

45 <400> 131

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcac 60
 tcggtggagg agtccggggg tcgcctggtc acgcctggga caccctgac actcacctgc 120
 acagtctctg gattctccct cagtagtcgt acaatgtcct gggcccgcca ggctccaggg 180
 aaggggctgg agtggatcgg atacatttgg agtgggtgga gcacatacta cgcgacctgg 240
 gcgaaaggcc gattcacat ctccaaaacc tcgaccacgg tggatctgaa aatcaccagt 300
 cggacaaccg aggacacggc cacctatttc tgtgccagat tgggcgatac tgggtggtcac 360
 gcttatgcta ctgcttaaa tctc 384

5 <210> 132
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 132
 cagtcacgtc agagtgttg taataaccag gacttatcc 39

15 <210> 133
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 133
 gaaatatcca aactggaatc t 21

25 <210> 134
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 134
 ctaggcggtt atgatgatga tgctgataat get 33

35 <210> 135
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 135
 agtcgtacaa tgtcc 15

45 <210> 136
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 136
 tacatttga gtggtgtag cacatactac ggcacctggg cgaaaggc 48

<210> 137
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 137
 ttggcgata ctggtgtgca cgcttatgct actcgcttaa atctc 45

<210> 138
 <211> 123
 <212> PRT

ES 2 610 607 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 138

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser
          20          25          30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ser
          35          40          45

Gln Ser Val Tyr Ser Asn Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50          55          60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 65          70          75          80

Gly Ala Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
          85          90          95

Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
          100          105          110

          Leu Gly Ala Tyr Asp Asp Asp Ala Asp Asn Ala
          115          120

```

5

<210> 139

<211> 126

10 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 139

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro
 20 25 30

Asp Glu Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Glu
 35 40 45

Gly Gly Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Ile Gly Ile Ser Tyr Asp Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
 65 70 75 80

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp
 85 90 95

Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 100 105 110

Val Arg Ser Leu Lys Tyr Pro Thr Val Thr Ser Asp Asp Leu
 115 120 125

<210> 140
 <211> 13
 5 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 140

Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Ser Asn Lys Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 141
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 141

Trp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

<210> 142
 <211> 11
 20 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 142

Leu Gly Ala Tyr Asp Asp Asp Ala Asp Asn Ala
 1 5 10

ES 2 610 607 T3

<210> 143
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 5
 <400> 143

Gly Gly Tyr Met Thr
 1 5

10 <210> 144
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 15 <400> 144

Ile Ser Tyr Asp Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

20 <210> 145
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 145

Ser Leu Lys Tyr Pro Thr Val Thr Ser Asp Asp Leu
 1 5 10

30 <210> 146
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 146

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 acatttgcag ccgtgctgac ccagacacca tcgtccgtgt ctgcagctgt gggaggcaca 120
 gtcagcatca gttgccagtc cagtcagagt gtttatagta ataagtacct agcctggtat 180
 cagcagaaac cagggcagcc tccaagctc ctgatctact ggacatccaa actggcatct 240
 ggggccccat cacggttcag cggcagtgga tctgggacac aattcactct caccatcagc 300
 ggcgtgcagt gtgacgatgc tgccacttac tactgtctag gcgcttatga tgatgatgct 360

35 gataatgct 369

<210> 147
 <211> 378
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 40 <400> 147

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
 tcggtggaag agtccggggg tcgcctggtc aagcctgacg aaaccctgac actcacctgc 120
 acagcctctg gattctccct ggagggcggc tacatgacct gggtccgcca ggctccaggg 180
 aaggggctgg aatggatcgg aatcagttat gatagtggta gcacatacta cgcgagctgg 240
 gcgaaaggcc gattcaccat ctccaagacc tcgtcgacca cggtagatct gaaaatgacc 300
 agtctgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgogtca gatcactaaa atactctact 360
 gttacttctg atgacttg 378

5 <210> 148
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 148
 cagtccagtc agagtgtta tagtaataag tacctagcc 39

15 <210> 149
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 149
 tggacatcca aactggcatc t 21

20 <210> 150
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

25 <400> 150
 ctaggcgctt atgatgatga tgctgataat gct 33

30 <210> 151
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 151
 ggccggctaca tgacc 15

35 <210> 152
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 152
 atcagttatg atagtggtag cacatactac gcgagctggg cgaaaggc 48

45 <210> 153
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 153
 tcactaaaat atctactgt tactctgat gacttg 36

<210> 154
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

ES 2 610 607 T3

<400> 154

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

5

<210> 155
<211> 129
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

10

<400> 155

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly

ES 2 610 607 T3

```

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

```

Leu

```

5 <210> 156
  <211> 13
  <212> PRT
  <213> Oryctolagus cuniculus
  <400> 156

```

```

10         Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asp Leu Ala
           1             5             10

```

```

15 <210> 157
  <211> 7
  <212> PRT
  <213> Oryctolagus cuniculus
  <400> 157

```

```

20         Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser
           1             5

```

```

25 <210> 158
  <211> 11
  <212> PRT
  <213> Oryctolagus cuniculus
  <400> 158

```

ES 2 610 607 T3

Leu Gly Gly Tyr Asp Asp Asp Ala Asp Asn Ala
 1 5 10

5 <210> 159
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 159

Ser Asn Thr Ile Asn
 1 5

10 <210> 160
 <211> 16
 <212> PRT
 15 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 160

Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Val Asn Gly
 1 5 10 15

20 <210> 161
 <211> 16
 <212> PRT
 25 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 161

Gly Gly Tyr Ala Ser Gly Gly Tyr Pro Tyr Ala Thr Arg Leu Asp Leu
 1 5 10 15

30 <210> 162
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 35 <400> 162

atggacacga gggcccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 acatttgacag ccgtgctgac ccagacacca tcaccogtgt ctgcagctgt gggaggcaca 120
 gtcaccatca gttgccagtc cagtcagagt gtttataata ataacgactt agcctggtat 180
 cagcagaaac cagggcagcc tctaaactc ctgatctatt atgcatccac tctggcatct 240
 ggggtcccat cgcggttcaa aggcagtgga tctgggacac agttcactct caccatcagc 300
 ggcgtgcagt gtgacgatgc tgccgcttac tactgtctag gcggttatga tgatgatgct 360
 gataatgct 369

40 <210> 163
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 45 <400> 163

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
 tcggtggagg agtcggggg tcgctgtg acgcctggga caccctgac actcacctgc 120
 acagtatctg gattatccct cagtagcaat acaataaact gggccgcca ggctccaggg 180
 aaggggctgg agtggatcgg atacatttg agtgggtgta gtacatacta cgcgagctgg 240
 gtgaatggtc gattcaccat ctccaaaacc tcgaccacgg tggatctgaa aatcaccagt 300
 ccgacaaccg aggacacggc cacctatttc tgtgccagag ggggttacgc tagtgggtgg 360
 tatecttatg ccaactcggtt ggatctc 387

5 <210> 164
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 164
 cagtcagtc agagtgtta taataataac gacttagcc 39

15 <210> 165
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 165
 tatgcatcca ctctggcatc t 21

20 <210> 166
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

25 <400> 166
 ctaggcgggt atgatgatga tgctgataat get 33

30 <210> 167
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 167
 agcaatacaa taaac 15

35 <210> 168
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 168
 tacattgga gtggtgtag tacatactac gcgagctggg tgaatggt 48

45 <210> 169
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 169
 gggggttacg ctagtgggtg ttatccttat gccactcggg tggatctc 48

<210> 170
 <211> 123
 <212> PRT

ES 2 610 607 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 170

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser
          20          25          30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser
          35          40          45

Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asp Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Arg Pro
 50          55          60

Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser
 65          70          75          80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Lys Gln Phe Thr
          85          90          95

Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
          100          105          110

Leu Gly Asp Tyr Asp Asp Asp Ala Asp Asn Thr
          115          120

```

5

<210> 171

<211> 123

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 171

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr Leu Ser
 35 40 45

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

Glu Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Pro Ser Gly Asn Thr Tyr Cys Ala Lys
 65 70 75 80

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val
 85 90 95

Asp Leu Lys Met Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
 100 105 110

Cys Ala Arg Asn Tyr Gly Gly Asp Glu Ser Leu
 115 120

<210> 172
 <211> 13
 5 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 172

Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asp Tyr Leu Ser
 1 5 10

<210> 173
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 173

Gly Ala Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

<210> 174
 <211> 11
 <212> PRT
 25 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 174

ES 2 610 607 T3

Leu Gly Asp Tyr Asp Asp Asp Ala Asp Asn Thr
 1 5 10

5 <210> 175
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 175

10 Thr Asn Tyr Tyr Leu Ser
 1 5

15 <210> 176
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 176

20 Ile Ile Tyr Pro Ser Gly Asn Thr Tyr Cys Ala Lys Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

25 <210> 177
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 177

30 Asn Tyr Gly Gly Asp Glu Ser Leu
 1 5

35 <210> 178
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 178

atggacaaga gggccccac tcagctgctg gggtcctgc tgctctggct ccaggtgcc 60
 acatttgcag ccgtgctgac ccagacacca tcctccgtgt ctgcagctgt gggaggcaca 120
 gtcaccatca attgccagtc cagtcagagt gtttataata acgactactt atcctggtat 180
 caacagagggc cagggaacg tccaagctc ctaatctatg gtgcttcaa actggcatct 240
 ggggtcccgt cacggttcaa aggcagtgga tetgggaaac agtttactct caccatcagc 300
 ggcgtgcagt gtgacgatgc tgccacttac tactgtctgg gcgattatga tgatgatgct 360
 gataatact 369

40 <210> 179
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 179

45

ES 2 610 607 T3

	atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaagggtg ccagtgtcag	60
	tcgctggagg agtccggggg tcgcctggtc acgcctggga caccctgac actcaactgc	120
	acagtctctg gattcacctt cagtaccaac tactacctga gctgggtccg ccaggctcca	180
	gggaaggggc tagaatggat cggaatcatt taccctagtg gtaacacata ttgcgcgaag	240
	tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa acctcgtoga ccacggtgga tctgaaaatg	300
	accagtccga caaccgagga cacagccacg tatttctgtg ccagaaatta tgggtggtgat	360
	gaaagtttg	369
5	<210> 180 <211> 39 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
10	<400> 180 cagtcagtc agagtgtta taataacgac tacttatcc	39
15	<210> 181 <211> 21 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	<400> 181 ggtgctcca aactggcatc t	21
20	<210> 182 <211> 33 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
25	<400> 182 ctgggcgatt atgatgatga tgctgataat act	33
30	<210> 183 <211> 18 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	<400> 183 accaactact acctgagc	18
35	<210> 184 <211> 48 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
40	<400> 184 atcattatc ctagtggtaa cacatattgc gogaagtggg cgaaaggc	48
45	<210> 185 <211> 24 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	<400> 185 aattatggtg gtgatgaaag ttg	24
50	<210> 186 <211> 119 <212> PRT	

ES 2 610 607 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 186

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
          20          25          30

Val Glu Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
          35          40          45

Glu Thr Ile Gly Asn Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln
          50          55          60

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val
65          70          75          80

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr
          85          90          95

Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Trp
          100          105          110

Cys Tyr Phe Gly Asp Ser Val
          115

```

5

<210> 187

<211> 128

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 187

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Thr Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Glu Gly Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asp Phe
 35 40 45

Ser Ser Gly Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 50 55 60

Leu Glu Trp Ile Ala Cys Ile Phe Thr Ile Thr Thr Asn Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80

Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr
 85 90 95

Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
 100 105 110

Tyr Leu Cys Ala Arg Gly Ile Tyr Ser Asp Asn Asn Tyr Tyr Ala Leu
 115 120 125

<210> 188
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 188

Gln Ala Ser Glu Thr Ile Gly Asn Ala Leu Ala
 1 5 10

<210> 189
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 189

Lys Ala Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

<210> 190
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 190

ES 2 610 607 T3

Gln Trp Cys Tyr Phe Gly Asp Ser Val
 1 5

5 <210> 191
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 191

10 Ser Gly Tyr Tyr Met Cys
 1 5

15 <210> 192
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 192

Cys Ile Phe Thr Ile Thr Thr Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys

1 5 10 15

20 Gly
 <210> 193
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 193

Gly Ile Tyr Ser Asp Asn Asn Tyr Tyr Ala Leu
 1 5 10

30 <210> 194
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 35 <400> 194

atggacacga	gggccccac	tcagctgctg	gggctcctgc	tgctctggct	cccaggtgcc	60
agatgtgatg	ttgtgatgac	ccagactcca	gcctccgtgg	aggcagctgt	gggaggcaca	120
gtcaccatca	agtgccaggc	cagtgagacc	attggcaatg	cattagcctg	gtatcagcag	180
aaatcagggc	agcctcccaa	gctcctgatc	tacaaggcat	ccaaactggc	atctggggtc	240
ccatcgcggt	tcaaaggcag	tggatctggg	acagagtaca	ctctcaccat	cagcgacctg	300
gagtgtgccg	atgctgccac	ttactactgt	caatggtggt	atcttgggtga	tagtggtt	357

40 <210> 195
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

ES 2 610 607 T3

<400> 195

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcactgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag	60
gagcagctgg tggagtccgg gggaggcctg gtccagcctg agggatccct gacactcacc	120
tgcacagcct ctggattcga cttcagtagc ggctactaca tgtgctgggt ccgccaggct	180
ccagggaagg ggctggagtg gatcgcgtgt attttacta ttactactaa cacttactac	240
gogagctggg cgaaaggccg attcaccato tccaagacct cgtcgaccac ggtgactctg	300
caaatgacca gtctgacagc cgcggacacg gccacctatc tctgtgagag agggatttat	360
tctgataata attattatgc cttg	384

5 <210> 196
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 196
 caggccagtg agaccattgg caatgcatta gcc 33

15 <210> 197
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 197
 aaggcatcca aactggcatc t 21

25 <210> 198
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 198
 caatgggttt attttggtga tagtggt 27

35 <210> 199
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 199
 agcggctact acatgtgc 18

45 <210> 200
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 200
 tgtattttca ctattactac taacacttac tacgcgagct gggcgaaagg c 51

55 <210> 201
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

60 <400> 201
 gggatttatt ctgataataa ttattatgcc ttg 33

<210> 202

ES 2 610 607 T3

<211> 119
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

5 <400> 202

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1           5           10           15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
           20           25           30

Val Glu Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
           35           40           45

Glu Ser Ile Gly Asn Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 50           55           60

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
65           70           75           80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
           85           90           95

Ile Ser Gly Val Gln Cys Ala Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys Gln Trp
           100          105          110

Cys Tyr Phe Gly Asp Ser Val
           115
  
```

10 <210> 203
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

15 <400> 203

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe
35 40 45

Ser Ser Gly Tyr Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Ser Ile Ala Cys Ile Phe Thr Ile Thr Asp Asn Thr Tyr Tyr
65 70 75 80

Ala Asn Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Pro Ser Ser Pro
85 90 95

Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ile Tyr Ser Thr Asp Asn Tyr Tyr Ala Leu
115 120 125

<210> 204

<211> 11

5 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 204

10 Gln Ala Ser Glu Ser Ile Gly Asn Ala Leu Ala
1 5 10

<210> 205

<211> 7

15 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 205

20 Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 206

<211> 9

25 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 206

Gln Trp Cys Tyr Phe Gly Asp Ser Val
1 5

ES 2 610 607 T3

5 <210> 207
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 207

Ser Gly Tyr Tyr Met Cys
 1 5

10 <210> 208
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 15 <400> 208

Cys Ile Phe Thr Ile Thr Asp Asn Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
 1 5 10 15

Gly

20 <210> 209
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 209

Gly Ile Tyr Ser Thr Asp Asn Tyr Tyr Ala Leu
 1 5 10

30 <210> 210
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 210

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggtcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 agatgtgatg ttgtgatgac ccagactcca gcctccgtgg aggcagctgt gggaggcaca 120
 gtcacccatca agtgccaggc cagtgagagc attggcaatg cattagcctg gtatcagcag 180
 aaaccagggc agcctcccaa gctcctgatc tacaaggcat ccactctggc atctggggtc 240
 ccatcgcggt tcagcggcag tggatctggg acagagttca ctctcaccat cagcggcggtg 300
 cagtgtgccg atgctgccgc ttactactgt caatggtggt attttggtga tagtggtt 357

40 <210> 211
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 211

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtoctgtgc tcaaagggtg ccagtgtcag 60
 cagcagctgg tggagtccgg gggaggcctg gtcaagccgg gggcatccct gacactcacc 120
 tgcaaagcct ctggattctc cttcagtagc ggctactaca tgtgctgggt ccgccaggct 180
 ccaggaaggg ggctggagtc gatcgcatgc atttttacta ttactgataa cacttactac 240
 gogaactggg cgaaaggccg attcaccatc tccaagccct cgtcgcccac ggtgactctg 300
 caaatgacca gtctgacagc cgcggacacg gccacctatt tctgtgagag ggggatttat 360
 tctactgata attattatgc cttg 384

5 <210> 212
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 212
 caggccagtg agagcattgg caatgcatta gcc 33

15 <210> 213
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 213
 aaggcatcca ctctggcatc t 21

25 <210> 214
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 214
 caatgggttt attttggtga tagtggt 27

35 <210> 215
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 215
 agcggctact acatgtgc 18

45 <210> 216
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 216
 tgcattttta ctattactga taacacttac tacgcgaact gggcgaaagg c 51

55 <210> 217
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

60 <400> 217
 gggatttatt ctactgataa ttattatgcc ttg 33

65 <210> 218
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

ES 2 610 607 T3

<400> 218

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
          20          25          30

Val Glu Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
          35          40          45

Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
          50          55          60

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

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
          85          90          95

Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys
          100          105          110

Thr Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Tyr Gly Ala Ala
          115          120

```

5

<210> 219
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10

<400> 219

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Ser Leu Ser
 35 40 45

Ser Asn Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Ile Gly Ile Ile Ser Tyr Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
 65 70 75 80

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp
 85 90 95

Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 100 105 110

Ala Arg Asp Asp Pro Thr Thr Val Met Val Met Leu Ile Pro Phe Gly
 115 120 125

Ala Gly Met Asp Leu
 130

5 <210> 220
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 220

10 Gln Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Asn
 1 5 10

15 <210> 221
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 221

20 Arg Ala Ser Thr Leu Glu Ser
 1 5

25 <210> 222
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 222

ES 2 610 607 T3

Gln Cys Thr Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Tyr Gly Ala Ala
 1 5 10

5 <210> 223
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 223

Ser Asn Ala Ile Ser
 1 5

10 <210> 224
 <211> 16
 <212> PRT
 15 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 224

Ile Ile Ser Tyr Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

20 <210> 225
 <211> 19
 <212> PRT
 25 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 225

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

Met Asp Leu

30 <210> 226
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 35 <400> 226

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 agatgtgatg ttgtgatgac ccagactcca gcctccgtgg aggcagctgt gggaggcaca 120
 gtcaccatca agtgccaggc cagtcagagc gttagtagct acttaaactg gtatcagcag 180
 aaaccagggc agcctcccaa gctcctgata tacagggcat cactctgga atctggggtc 240
 ccatcgcggt tcaaaggcag tggatctggg acagagttca ctctaccat cagcgacctg 300
 gagtgtgccg atgtgcccac ttactactgt caatgtactt atggtactag tagtagttat 360
 ggtgctgct 369

40 <210> 227
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

ES 2 610 607 T3

<400> 227

atggagactg ggctgogctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag	60
toggtggagg agtccggggg togcctggtc acgcctggga caccctgac actcacctgc	120
accgtctctg gtatctocct cagtagcaat gcaataagct gggtcogcca ggctccaggg	180
aaggggctgg aatggatcgg aatcattagt tatagtggta ccacatacta ogcgagctgg	240
gcgaaaggcc gattcaccaat ctccaaaacc tcgtcgacca cggatgatct gaaaatcaact	300
agtccgacaa ccgaggacac ggccacctac ttctgtgcca gagatgacct tacgacagtt	360
atggttatgt tgataccttt tggagccggc atggacctc	399

5 <210> 228
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 228
 caggccagtc agagcgtag tagtactta aac 33

15 <210> 229
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 229
 agggcatcca ctctggaatc t 21

25 <210> 230
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 230
 caatgtactt atggtactag tagtagttat ggtgctgct 39

35 <210> 231
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 231
 agcaatgcaa taagc 15

45 <210> 232
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 232
 atcattagtt atagtggtag cacatactac gcgagctggg cgaaaggc 48

55 <210> 233
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

60 <400> 233
 gatgacccta cgacagttat gggtatgttg atacctttg gagccggcat ggacctc 57

<210> 234
 <211> 125

ES 2 610 607 T3

<212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 234

5

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1           5           10           15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Ala Ser Pro
          20           25           30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser
          35           40           45

Gln Ser Val Tyr Lys Asn Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
          50           55           60

Gly Gln Pro Pro Lys Gly Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Asp Ser
65           70           75           80

Gly Val Pro Leu Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
          85           90           95

Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
          100          105          110

Leu Gly Ser Tyr Asp Cys Ser Ser Gly Asp Cys Tyr Ala
          115          120          125
  
```

<210> 235
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10

<400> 235

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro
 20 25 30

Glu Gly Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
 35 40 45

Ser Tyr Trp Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Ile Ala Cys Ile Val Thr Gly Asn Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asn
 65 70 75 80

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val
 85 90 95

Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
 100 105 110

Cys Ala Lys Ala Tyr Asp Leu
 115

5 <210> 236
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 236

10 Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn Asn Tyr Leu Ser
 1 5 10

15 <210> 237
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 237

20 Ser Ala Ser Thr Leu Asp Ser
 1 5

25 <210> 238
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 238

Leu Gly Ser Tyr Asp Cys Ser Ser Gly Asp Cys Tyr Ala
 1 5 10

ES 2 610 607 T3

5 <210> 239
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 239

Ser Tyr Trp Met Cys
 1 5

10 <210> 240
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 15 <400> 240

Cys Ile Val Thr Gly Asn Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
 1 5 10 15

Gly

20 <210> 241
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 241

Ala Tyr Asp Leu
 1

30 <210> 242
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 242

atggacacga	gggccccac	tcagctgctg	gggtcctgc	tgctctggct	cccaggtgcc	60
acatttggcc	aagtgctgac	ccagactgca	tgcgccgtgt	ctgcagctgt	gggaggcaca	120
gtcaccatca	actgccaggc	cagtcagagt	gtttataaga	aaaactactt	atcctgggat	180
cagcagaaac	cagggcagcc	tcccaaaggc	ctgatctatt	ctgcatcgac	tctagattct	240
gggtcccat	tgcggttcag	cggcagtgga	tctgggacac	agttcactct	caccatcagc	300
gacgtgcagt	gtgacgatgc	tgccacttac	tactgtctag	gcagttatga	ttgtagtagt	360
ggtgattggt	atgct					375

40 <210> 243
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 243

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
 tcgttgagg agtccggggg agacctggtc aagcctgagg gatccctgac actcacctgc 120
 acagcctctg gattctcctt cagtagctac tggatgtgct gggtcgcoca ggctccaggg 180
 aaggggctgg agtggatcgc atgcattggt actggtaatg gtaacactta ctacgcgaac 240
 tgggcgaaag gccgattcac catctccaaa acctcgtcga ccacggtgac tctgcaaag 300
 accagtctga cagccgcgga cacggccacc tatttttgtg cgaaagccta tgacttg 357

5 <210> 244
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 244
 caggccagtc agagtgtta taagaacaac tacttatcc 39

15 <210> 245
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 245
 tctgcatcga ctctagattc t 21

25 <210> 246
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 246
 ctaggcagtt atgattgtag tagtgggtgat tgttatgct 39

35 <210> 247
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 247
 agctactgga tgtgc 15

45 <210> 248
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 248
 tgcattgta ctggtaatgg taacacttac tacgcgaact gggcgaaagg c 51

55 <210> 249
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 249
 gcctatgact tg 12

<210> 250
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 250

ES 2 610 607 T3

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ser Thr Phe Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro
 20 25 30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys Gln Ala Ser
 35 40 45

Gln Ser Val Tyr Asp Asn Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Thr Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
 85 90 95

Leu Thr Ile Thr Asp Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Ala Gly Val Phe Asn Asp Asp Ser Asp Asp Ala
 115 120

5 <210> 251
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 251

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Pro Lys Gly
 1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Leu Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 35 40 45

Ala Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Ile Gly Phe Ile Thr Leu Ser Asp His Ile Ser Tyr Ala Arg Trp
 65 70 75 80

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu
 85 90 95

Lys Met Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 100 105 110

Arg Ser Arg Gly Trp Gly Ala Met Gly Arg Leu Asp Leu
 115 120 125

5 <210> 252
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 252

10 Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Asp Asn Asn Tyr Leu Ser
 1 5 10

15 <210> 253
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 253

20 Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 254
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 254

Ala Gly Val Phe Asn Asp Asp Ser Asp Asp Ala
 1 5 10

ES 2 610 607 T3

5 <210> 255
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 255

Ala Tyr Tyr Met Ser
 1 5

10 <210> 256
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 15 <400> 256

Phe Ile Thr Leu Ser Asp His Ile Ser Tyr Ala Arg Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

20 <210> 257
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 257

Ser Arg Gly Trp Gly Ala Met Gly Arg Leu Asp Leu
 1 5 10

30 <210> 258
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 258

atggacacga	gggccccac	tcagctgctg	gggctcctgc	tgctctggct	cccaggttcc	60
acatttgccg	ccgtgctgac	ccagactcca	tctcccgtgt	ctgcagctgt	gggaggcaca	120
gtcagcatca	gttgccaggc	cagtcagagt	gtttatgaca	acaactatit	atcctggtat	180
cagcagaaac	caggacagcc	tccaagctc	ctgatctatg	gtgcatccac	tctggcatct	240
ggggtcccat	cgcggttcaa	aggcaoggga	tctgggacac	agttcactct	caccatcaca	300
gacgtgcagt	gtgacgatgc	tgccaacttac	tattgtgcag	gcgtttttaa	tgatgatagt	360
gatgatgcc						369

35 <210> 259
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 40 <400> 259

ES 2 610 607 T3

	atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtogetgtgc ccaaaggtgt ccagtgtcag	60
	tcgctggagg agtccggggg tcgctgggc acgcctggga caccctgac actcacctgc	120
	acactctctg gattctccct cagtgcatac tataatgagct gggcccgcca ggtccaggg	180
	aaggggctgg aatggatcgg attcattact ctgagtgatc atatatctta cgcgaggtgg	240
	gcgaaaggcc gattcaccat ctccaaaacc tcgaccacgg tggatctgaa aatgaccagt	300
	ccgacaaccg aggacacggc cacctatttc tgtgccagga gtcgtggctg gggtgcaatg	360
	ggtcgggttg atctc	375
5	<210> 260 <211> 39 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
10	<400> 260 caggccagtc agagtgtta tgacaacaac tatttatcc	39
15	<210> 261 <211> 21 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	<400> 261 ggtgcatcca ctctggcatc t	21
20	<210> 262 <211> 33 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
25	<400> 262 gcaggcgtt ttaatgatga tagtgatgat gcc	33
30	<210> 263 <211> 15 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	<400> 263 gcatactata tgagc	15
35	<210> 264 <211> 48 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
40	<400> 264 ttcattactc tgagtgatca tatactctac gcgaggtggg cgaaaggc	48
45	<210> 265 <211> 36 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
50	<400> 265 agtcgtggct ggggtgcaat gggtcggttg gatctc	36
	<210> 266 <211> 123 <212> PRT <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	

ES 2 610 607 T3

<400> 266

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro
          20          25          30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ala Ser
          35          40          45

Gln Ser Val Tyr Asn Asn Lys Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ser
          50          55          60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Leu Ala Ser
65          70          75          80

Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
          85          90          95

Leu Thr Val Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
          100          105          110

Leu Gly Val Phe Asp Asp Asp Ala Asp Asn Ala
          115          120

```

5 <210> 267
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 267

```

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1          5          10          15

```

ES 2 610 607 T3

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 35 40 45

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

Tyr Ile Gly Val Ile Gly Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp
 65 70 75 80

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Ala Leu
 85 90 95

Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val
 100 105 110

Arg Ser Leu Ser Ser Ile Thr Phe Leu
 115 120

5 <210> 268
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 268

10 Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Lys Asn Leu Ala
 1 5 10

15 <210> 269
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 269

20 Trp Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 270
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 270

30 Leu Gly Val Phe Asp Asp Asp Ala Asp Asn Ala
 1 5 10

30 <210> 271
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

ES 2 610 607 T3

<400> 271

Ser Tyr Ser Met Thr
1 5

5 <210> 272
<211> 16
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 272

Val Ile Gly Thr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

15 <210> 273
<211> 8
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 273

Ser Leu Ser Ser Ile Thr Phe Leu
1 5

25 <210> 274
<211> 369
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 274

atggacacga	gggccccac	tcagctgctg	gggctcctgc	tgctctggct	cccaggtgcc	60
acattcgag	ccgtgctgac	ccagacacca	tcgcccgtgt	ctgctggctgt	gggaggcaca	120
gtcaccatca	gttgccaggc	cagtcagagt	gtttataaca	acaaaaattt	agcctggtat	180
cagcagaaat	cagggcagcc	tcccaagctc	ctgatctact	gggcatccac	tctggcatct	240
ggggtctcat	cgcggttcag	cggcagtgga	tctgggacac	agttcactct	caccgtcagc	300
ggcgtgcagt	gtgacgatgc	tgccacttac	tactgtctag	gcgtttttga	tgatgatgct	360
gataatgct						369

30 <210> 275
<211> 363
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 275

ES 2 610 607 T3

	atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccaatgtcag	60
	tcgggtggagg agtccggggg tcgcctggtc acgcctggga caccctgac actcacctgc	120
	acagcctctg gattctccct cagtagctac tccatgacct gggtcgcgcca ggctccaggg	180
	aaggggctgg aatatatcgg agtcattggg actagtggta gcacatacta cgcgacctgg	240
	gcgaaaggcc gattcaccaat ctccagaacc tcgaccacgg tggctctgaa aatcaccagt	300
	ccgacaaccg aggacacggc cacctatttc tgtgtcagga gtctttcttc tattactttc	360
	ttg	363
5	<210> 276 <211> 39 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
10	<400> 276 cagggcagtc agagtgttta taacaacaaa aatthagcc	39
15	<210> 277 <211> 21 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	<400> 277 tggcatcca ctctggcatc t	21
20	<210> 278 <211> 33 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
25	<400> 278 ctaggcgttt ttgatgatga tgctgataat get	33
30	<210> 279 <211> 15 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	<400> 279 agctactcca tgacc	15
35	<210> 280 <211> 48 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
40	<400> 280 gtcattggta ctagtggtag cacatactac gcgacctggg cgaaaggc	48
45	<210> 281 <211> 24 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
50	<400> 281 agtctttctt ctattacttt cttg	24
	<210> 282 <211> 120 <212> PRT	

ES 2 610 607 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 282

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1          5          10          15

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

Val Glu Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser
          35          40          45

Gln Asn Ile Tyr Arg Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
          50          55          60

Pro Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
65          70          75          80

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
          85          90          95

Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser
          100          105          110

Tyr Tyr Ser Ser Asn Ser Val Ala
          115          120

```

5

<210> 283

<211> 128

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 283

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Glu Gly Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Glu Leu Asp Phe
 35 40 45

Ser Ser Gly Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly
 50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Tyr Thr Gly Ser Ser Gly Ser Thr Phe
 65 70 75 80

Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser
 85 90 95

Thr Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala
 100 105 110

Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Tyr Ser Gly Phe Gly Tyr Phe Lys Leu
 115 120 125

<210> 284
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

5

<400> 284

Gln Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Arg Tyr Leu Ala
 1 5 10

10

<210> 285
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

15

<400> 285

Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

20

<210> 286
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

25

<400> 286

Gln Ser Tyr Tyr Ser Ser Asn Ser Val Ala
 1 5 10

ES 2 610 607 T3

5 <210> 287
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 287

Ser Gly Tyr Trp Ile Cys
 1 5

10 <210> 288
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 15 <400> 288

Cys Ile Tyr Thr Gly Ser Ser Gly Ser Thr Phe Tyr Ala Ser Trp Ala
 1 5 10 15

Lys Gly

20 <210> 289
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 289

Gly Tyr Ser Gly Phe Gly Tyr Phe Lys Leu
 1 5 10

30 <210> 290
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 290

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctgget cccaggtgcc 60
 agatgtgcat tcgaattgac ccagactcca gcctccgtgg aggcagctgt gggaggcaca 120
 gtcaccatca attgccaggc cagtcagaac atttatagat acttagcctg gtatcagcag 180
 aaaccagggc agcctcccaa gttcctgatc tatctggcat ctactctggc atctggggtc 240
 ccatcgcggt ttaaaggcag tggatctggg acagagttca ctetcaccat cagcgacctg 300
 gagtgtgceg atgctgccac ttactactgt caaagttatt atagtagtaa tagtgtcgct 360

35 <210> 291
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 40 <400> 291

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
gagcagctgg tggagtccgg gggagacctg gtccagcctg agggatccct gacactcacc 120
tgcacagctt ctgagttaga cttcagtagc ggctactgga tatgctgggt ccgccaggtt 180
ccaggggaagg ggctggagtg gatcggatgc atttatactg gtagtagtgg tagcactttt 240
tacgcgagtt gggcgaaagg ccgattcacc atctccaaaa cctcgtcgcac cacggtgact 300
ctgcaaatga ccagtctgac agccgcggac acggccacct atttctgtgc gagaggttat 360
agtggctttg gttactttaa gttg 384

5 <210> 292
<211> 33
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 292
caggccagtc agaacattta tagatactta gcc 33

15 <210> 293
<211> 21
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 293
ctggcatcta ctctggcatc t 21

25 <210> 294
<211> 30
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 294
caaagttatt atagtagtaa tagtgcgct 30

35 <210> 295
<211> 18
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 295
agcggctact ggatatgc 18

45 <210> 296
<211> 54
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 296
tgcattata ctggtagtag tggtagcact tttacgcga gttgggcgaa aggc 54

55 <210> 297
<211> 30
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

60 <400> 297
ggttatagtg gctttggtta cttaagttg 30

65 <210> 298
<211> 122
<212> PRT

ES 2 610 607 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 298

```

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

```

5

<210> 299

<211> 123

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 299

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 35 40 45

Ser Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Ile Gly Ile Ile Thr Thr Ser Gly Asn Thr Phe Tyr Ala Ser Trp
 65 70 75 80

Ala Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu
 85 90 95

Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 100 105 110

Arg Thr Ser Asp Ile Phe Tyr Tyr Arg Asn Leu
 115 120

5 <210> 300
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 300

10 Gln Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Arg Leu Leu Ala
 1 5 10

15 <210> 301
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 301

20 Asp Ser Ser Asp Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 302
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 302

Gln Gln Ala Trp Ser Tyr Ser Asp Ile Asp Asn Ala
 1 5 10

ES 2 610 607 T3

<210> 303
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 5
 <400> 303

Ser Tyr Tyr Met Ser
 1 5

10 <210> 304
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 15 <400> 304

Ile Ile Thr Thr Ser Gly Asn Thr Phe Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

20 <210> 305
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 305

Thr Ser Asp Ile Phe Tyr Tyr Arg Asn Leu
 1 5 10

30 <210> 306
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 306

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 agatgtgcct atgatatgac ccagactcca gcctctgtgg aggtagctgt gggaggcaca 120
 gtcacccatca agtgccaggc cagtgaggac atttataggt tattggcctg gtatcaacag 180
 aaaccagggc agcctcccaa gctcctgatc tatgattcat ccgatctggc atctggggtc 240
 ccatcgcggt tcaaaggcag tggatctggg acagagttca ctctcgccat cagcgggtgtg 300
 cagtgtgacg atgctgccac ttactactgt caacaggctt ggagttatag tgatattgat 360
 35 aatgct 366

<210> 307
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 40 <400> 307

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaagggtg ccagtgtcag 60
 tcgggtggagg agtccggggg tcgcctggtc acgccgggga caccctgac actcacctgc 120
 acagcctctg gattctccct cagtagctac tacatgagct gggtcgcga ggctccaggg 180
 aaggggctgg aatggatogg aatcattact actagtggta atacatttta cgcgagctgg 240
 gcgaaaggcc ggctcaccat ctccagaacc tcgaccaogg tggatctgaa aatcaccagt 300
 ccgacaaccg aggacacggc cacctatttc tgtgccagaa cttctgatat tttttattat 360
 cgtaacttg 369

5 <210> 308
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 308
 caggccagtg aggacattta taggtattg gcc 33

15 <210> 309
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 309
 gattcatccg atctggcatc t 21

25 <210> 310
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 310
 caacaggctt ggagttatag tgatattgat aatgct 36

35 <210> 311
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 311
 agtactaca tgagc 15

45 <210> 312
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 312
 atcattacta ctagtggtaa tacattttac gcgagctggg cgaaaggc 48

55 <210> 313
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

60 <400> 313
 acttctgata tttttatta tcgtaacttg 30

65 <210> 314
 <211> 123
 <212> PRT

ES 2 610 607 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 314

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Ala Ser Pro
          20          25          30

Val Ser Ala Ala Val Gly Ala Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser
          35          40          45

Gln Ser Val Tyr Asn Asp Met Asp Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro
          50          55          60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
65          70          75          80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
          85          90          95

Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
          100          105          110

Leu Gly Ala Phe Asp Asp Asp Ala Asp Asn Thr
          115          120

```

5

<210> 315

<211> 129

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 315

ES 2 610 607 T3

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

Leu

5 <210> 316
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 316

10 Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asp Met Asp Leu Ala
 1 5 10

15 <210> 317
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 317

20 Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 318
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 318

ES 2 610 607 T3

Leu Gly Ala Phe Asp Asp Asp Ala Asp Asn Thr
 1 5 10

5 <210> 319
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 319

Arg His Ala Ile Thr
 1 5

10 <210> 320
 <211> 16
 <212> PRT
 15 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 320

Cys Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

20 <210> 321
 <211> 16
 <212> PRT
 25 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 321

Val Ile Gly Asp Thr Ala Gly Tyr Ala Tyr Phe Thr Gly Leu Asp Leu
 1 5 10 15

30 <210> 322
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 35 <400> 322

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggetcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 acgtttgcag ccgtgctgac ccagactgca tcaccogtgt ctgccgctgt gggagccaca 120
 gtcaccatca actgccagtc cagtcagagt gtttataatg acatggactt agcctggttt 180
 cagcagaaac cagggcagcc tcccaagctc ctgatctatt ctgcatccac tctggcatct 240
 ggggtcccat cgcggttcag cggcagtgga tctgggacag agttcactct caccatcagc 300
 ggcgtgcagt gtgacgatgc tgccaettac tactgtctag gcgcttttga tgatgatgct 360
 gataatact 369

40 <210> 323
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 45 <400> 323

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gotttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
 tcggtggagg agtccggggg tgcctggtc acgcctggga caccctgac actcacctgc 120
 acagtctctg gattctcoct cactaggcat gcaataacct gggccgcca ggctccaggg 180
 aaggggctgg aatggatcgg atgcatttgg agtggtggta gcacatacta cgcgacctgg 240
 gcgaaaggcc gattcaccat ctccaaaacc tcgaccacgg tggatctcag aatcaccagt 300
 ccgacaaccg aggacacggc cacctacttc tgtgccagag tcattggcga tactgctggt 360
 tatgcttatt ttacggggct tgacttg 387

5 <210> 324
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 324
 cagtcagtc agagtgtta taatgacatg gacttagcc 39

15 <210> 325
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 325
 tctgcatcca ctctggcatc t 21

25 <210> 326
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 326
 ctaggcgctt ttgatgatga tgctgataat act 33

35 <210> 327
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 327
 aggcatgcaa taacc 15

45 <210> 328
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 328
 tgcatttga gtggtgtag cacatactac gcgacctggg cgaaaggc 48

<210> 329
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 329
 gtcattggcg atactgctgg ttatgcttat ttacggggc ttgacttg 48

<210> 330
 <211> 121
 <212> PRT

ES 2 610 607 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 330

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
          20          25          30

Val Glu Val Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
          35          40          45

Gln Ser Val Tyr Asn Trp Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
          50          55          60

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly Val
65          70          75          80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
          85          90          95

Ile Ser Gly Val Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
          100          105          110

Gly Tyr Thr Ser Asp Val Asp Asn Val
          115          120

```

5

<210> 331

<211> 130

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 331

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser
 35 40 45

Ser Tyr Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Tyr Ile Gly Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp
 65 70 75 80

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Ala Ser Ser Thr Thr Val Asp
 85 90 95

Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Phe Cys
 100 105 110

Ala Arg Gly Gly Ala Gly Ser Gly Gly Val Trp Leu Leu Asp Gly Phe
 115 120 125

Asp Pro
 130

<210> 332
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 332

Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Asn Trp Leu Ser
 1 5 10

<210> 333
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 333

Thr Ala Ser Ser Leu Ala Ser
 1 5

<210> 334
 <211> 11
 <212> PRT
 25 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 334

ES 2 610 607 T3

Gln Gln Gly Tyr Thr Ser Asp Val Asp Asn Val
 1 5 10

5 <210> 335
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 335

Ser Tyr Ala Met Gly
 1 5

10
 15 <210> 336
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 336

Ile Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

20 <210> 337
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 337

Gly Gly Ala Gly Ser Gly Gly Val Trp Leu Leu Asp Gly Phe Asp Pro
 1 5 10 15

30 <210> 338
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 35 <400> 338

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 agatgtgcct atgatatgac ccagactcca gcctctgtgg aggtagctgt gggaggcaca 120
 gtcaccatca agtgccaggc cagtcagagt gtttataatt ggttatcctg gtatcagcag 180
 aaaccagggc agcctcccaa gctcctgatc tatactgcat ccagtctggc atctggggtc 240
 ccatcgcggt tcagtggcag tggatctggg acagagttca ctctcaccat cagcggcgtg 300
 gagtgtgccg atgctgccac ttactactgt caacaggggt atactagtga tgttgataat 360
 gtt 363

40 <210> 339
 <211> 390
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 45 <400> 339

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
 tcgctggagg aggccggggg tcgcctggtc acgcctggga caccctgac actcacctgc 120
 acagtctctg gaatcgacct cagtagctat gcaatgggct gggcccgcca ggctccaggg 180
 aaggggctgg aatacatcgg aatcattagt agtagtggtg gcacatacta cgcgacctgg 240
 gcgaaaggcc gattcaccat ctcaaacgcc tcgtcgacca cggcggatct gaaaattacc 300
 agtccgacaa ccgaggactc ggccacatat ttctgtgcca gaggggggtgc tggtagtggt 360
 ggtgtttggc tgcttgatgg ttttgatccc 390

5 <210> 340
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 340
 caggccagtc agagtgttta taattggta tcc 33

15 <210> 341
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 341
 actgcatcca gtctggcatc t 21

25 <210> 342
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 342
 caacagggtt atactagtga tggtagaat gtt 33

35 <210> 343
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 343
 agctatgcaa tgggc 15

45 <210> 344
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 344
 atcattagta gtagtggtag cacatactac gcgacctggg cgaaaggc 48

55 <210> 345
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

60 <400> 345
 ggggggtgctg gtagtggtgg tggttggctg cttgatggtt ttgatccc 48

65 <210> 346
 <211> 123
 <212> PRT

ES 2 610 607 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 346

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Lys Cys Ala Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala
20          25          30

Ser Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala
35          40          45

Ser Glu Asn Ile Tyr Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50          55          60

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Val Gly Asp Leu Ala Ser Gly
65          70          75

Val Ser Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu
85          90          95

Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
100         105         110

Gln Gly Tyr Ser Ser Ser Tyr Val Asp Asn Val
115          120

```

5

<210> 347

<211> 130

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 347

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

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

Pro Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Asn Asp Tyr Ala Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Arg Ser Ser Gly Thr Thr Ala Tyr Ala Thr
 65 70 75 80

Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Thr Ser Thr Thr Val Asp
 85 90 95

Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 100 105 110

Ala Arg Gly Gly Ala Gly Ser Ser Gly Val Trp Ile Leu Asp Gly Phe
 115 120 125

Ala Pro
 130

5 <210> 348
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 348

10 Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Asn Trp Leu Ala
 1 5 10

15 <210> 349
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 349

20 Thr Val Gly Asp Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 350
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 350

ES 2 610 607 T3

Gln Gln Gly Tyr Ser Ser Ser Tyr Val Asp Asn Val
 1 5 10

5 <210> 351
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 351

Asp Tyr Ala Val Gly
 1 5

15 <210> 352
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 352

20 Tyr Ile Arg Ser Ser Gly Thr Thr Ala Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

25 <210> 353
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 353

30 Gly Gly Ala Gly Ser Ser Gly Val Trp Ile Leu Asp Gly Phe Ala Pro
 1 5 10 15

35 <210> 354
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 354

atggacacga gggcccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 aaatgtgccg atgttgtgat gaccagact ccagcctccg tgtctgcagc tgtgggagge 120
 acagtcacca tcaattgcca ggccagttag aacatttata attggttagc ctggtatcag 180
 cagaaaccag ggcagcctcc caagctcctg atctatactg taggcgatct ggcacatctggg 240
 gtctcatcgc ggttcaaagg cagtggatct gggacagagt tcactctcac catcagcgac 300
 ctggagtggt cogatgctgc cacttactat tgccaacagg gttatagtag tagttatggt 360
 gataatggt 369

40 <210> 355
 <211> 390
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

45 <400> 355

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
gagcagctga aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacacccct gacactcacc 120
tgcacagtct ctggattctc cctcaatgac tatgcagtgg gctggttcog ccaggctcca 180
gggaaggggc tggaatggat cggatacatt cgtagtagtg gtaccacagc ctacgcgacc 240
tgggcgaaag gccgattcac catctccgct acctogacca cggtaggatct gaaaatcacc 300
agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gaggggggtgc tggtagtagt 360
ggtgtgtgga tccttgatgg ttttgctccc 390

5 <210> 356
<211> 33
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 356
caggccagtg agaacattta taattggta gcc 33

15 <210> 357
<211> 21
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 357
actgtaggcg atctggcatc t 21

25 <210> 358
<211> 36
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 358
caacagggtt atagtagtag ttatgtgat aatgtt 36

35 <210> 359
<211> 15
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 359
gactatgcag tgggc 15

45 <210> 360
<211> 48
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 360
tacattcgta gtagtggtac cacagcctac gcgacctggg cgaaaggc 48

55 <210> 361
<211> 48
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

60 <400> 361
gggggtgctg gtagtagtgg tgtgtggatc ctgatggtt ttgctccc 48

65 <210> 362
<211> 121
<212> PRT

ES 2 610 607 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 362

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1           5           10           15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser
 20           25           30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser
 35           40           45

Gln Ser Val Tyr Gln Asn Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro
 50           55           60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ala Thr Leu Ala Ser
 65           70           75

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
 85           90           95

Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100          105          110

Ala Gly Ala Tyr Arg Asp Val Asp Ser
 115          120

```

5

<210> 363

<211> 130

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 363

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro
 20 25 30

Gly Ala Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Thr
 35 40 45

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

Glu Trp Ile Ala Cys Ile Asp Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr
 65 70 75 80

Ala Thr Trp Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr
 85 90 95

Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Lys Trp Asp Tyr Gly Gly Asn Val Gly Trp Gly Tyr
 115 120 125

Asp Leu
 130

5 <210> 364
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 364

10 Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Gln Asn Asn Tyr Leu Ser
 1 5 10

15 <210> 365
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 365

20 Gly Ala Ala Thr Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 366
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 366

ES 2 610 607 T3

Ala Gly Ala Tyr Arg Asp Val Asp Ser
1 5

5 <210> 367
<211> 6
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 367

10 Ser Thr Tyr Tyr Ile Tyr
1 5

<210> 368
<211> 18
<212> PRT
15 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 368

Cys Ile Asp Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Val
1 5 10 15

20 Asn Gly

<210> 369
<211> 13
<212> PRT
25 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 369

Trp Asp Tyr Gly Gly Asn Val Gly Trp Gly Tyr Asp Leu
1 5 10

30 <210> 370
<211> 363
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

35 <400> 370

```

atggacacga gggcccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc      60
acatttgctc aagtgctgac ccagactcca tcctccgtgt ctgcagctgt gggaggcaca      120
gtcaccatca attgccaggc cagtcagagt gtttatcaga acaactactt atoctggttt      180
cagcagaaac cagggcagcc toccaagctc ctgatctatg gtgcggccac tctggcatct      240
ggggtcccat cgcggttcaa aggcagtgga tctgggacac agttcactct caccatcagc      300
gacctggagt gtgacgatgc tgccacttac tactgtgcag gcgcttatag ggatgtggat      360
tct                                                                                   363

```

40 <210> 371
<211> 390
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

ES 2 610 607 T3

<400> 371

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag	60
tcgttggagg agtccggggg agacctggtc aagcctgggg catccctgac actcacctgc	120
acagcctctg gattctcctt tactagtacc tactacatct actgggtccg ccaggctcca	180
gggaaggggc tggagtggat cgcattgtatt gatgctggta gtagtggtag cacttactac	240
gcgacctggg tgaatggccg attcaccatc tccaaaacct cgtcgaccac ggtgactctg	300
caaatgacca gtctgacagc cgcggacacg gccacctatt tctgtgcgaa atgggattat	360
ggtggtaatg ttggttgggg ttatgacttg	390

5 <210> 372
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 372
 caggccagtc agagtgtta tcagaacaac tacttatcc 39

15 <210> 373
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 373
 ggtgcggcca ctctggcatc t 21

25 <210> 374
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 374
 gcaggcgctt atagggatgt ggattct 27

35 <210> 375
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 375
 agtacctact acatctac 18

45 <210> 376
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 376
 tgtattgatg ctggtagtag tggtagcact tactacgca cctgggtgaa tggc 54

55 <210> 377
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

60 <400> 377
 tgggattatg gtggtaatgt tggttgggt tatgacttg 39

<210> 378

ES 2 610 607 T3

<211> 120
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

5 <400> 378

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

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

Val Glu Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
          35          40          45

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50          55          60

Pro Pro Lys Phe Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
65          70          75          80

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
          85          90          95

Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser
          100          105          110

Tyr Tyr Asp Ser Val Ser Asn Pro
          115          120
  
```

10 <210> 379
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

15 <400> 379

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro
 20 25 30

Glu Gly Ser Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Leu Asp Leu Gly
 35 40 45

Thr Tyr Trp Phe Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Ala Cys Ile Tyr Thr Gly Ser Ser Gly Ser Thr Phe Tyr
 65 70 75 80

Ala Ser Trp Val Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr
 85 90 95

Thr Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Tyr Ser Gly Tyr Gly Tyr Phe Lys Leu
 115 120 125

<210> 380
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 380

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 381
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 381

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

<210> 382
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 382

ES 2 610 607 T3

Gln Ser Tyr Tyr Asp Ser Val Ser Asn Pro
 1 5 10

5 <210> 383
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 383

Thr Tyr Trp Phe Met Cys
 1 5

10
 15 <210> 384
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 384

Cys Ile Tyr Thr Gly Ser Ser Gly Ser Thr Phe Tyr Ala Ser Trp Val
 1 5 10 15

Asn Gly

20 <210> 385
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

25 <400> 385

Gly Tyr Ser Gly Tyr Gly Tyr Phe Lys Leu
 1 5 10

30 <210> 386
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

35 <400> 386

```

atggacacga gggcccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc      60
agatgtgcat tcgaattgac ccagactcca tcctccgtgg aggcagctgt gggaggcaca      120
gtcaccatca agtgccaggc cagtcagagc attagtagtt acttagcctg gtatcagcag      180
aaaccagggc agcctcccaa gttcctgata tacagggcgt cactctggc atctggggtc      240
ccatcgcgat tcaaaggcag tggatctggg acagagttca ctctcaccat cagcgcacct      300
gagtgtgccg atgctgccac ttactactgt caaagctatt atgatagtgt ttcaaattcct      360
  
```

40 <210> 387
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

45 <400> 387

ES 2 610 607 T3

	atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag	60
	tcgttgagg agtccggggg agacctggtc aagcctgagg gatccctgac actcacctgc	120
	aaagcctctg gactcgacct cggtagctac tggttcatgt gctgggtccg ccaggetcca	180
	gggaaggggc tggagtggat cgcttgtatt tatactggta gtagtggttc cactttctac	240
	gcgagctggg tgaatggccg attcaccatc tccaaaacct cgtcgaccac ggtgactctg	300
	caaatgacca gtctgacagc cgcggacacg gccacttatt tttgtgcgag aggttatagt	360
	ggttatggtt attttaagtt g	381
5	<210> 388 <211> 33 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
10	<400> 388 caggccagtc agagcattag tagttactta gcc 33	
15	<210> 389 <211> 21 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
20	<400> 389 agggcgtcca ctctggcatc t 21	
25	<210> 390 <211> 30 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
30	<400> 390 caaagctatt atgatagtg tcaaatcct 30	
35	<210> 391 <211> 18 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
40	<400> 391 acctactggt tcatgtgc 18	
45	<210> 392 <211> 54 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
50	<400> 392 tgtattata ctgtagtag tggttccact ttctacgoga gctgggtgaa tggc 54	
55	<210> 393 <211> 30 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	<400> 393 ggttatagtg gttatggta ttttaagttg 30	
	<210> 394 <211> 124 <212> PRT	

ES 2 610 607 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 394

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

Leu Pro Gly Val Thr Phe Ala Ile Glu Met Thr Gln Ser Pro Phe Ser
          20          25          30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys Gln Ala Ser
          35          40          45

Gln Ser Val Tyr Lys Asn Asn Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Ser
          50          55          60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ala Leu Ala Ser
65          70          75          80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
          85          90          95

Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
          100          105          110

Ala Gly Ala Ile Thr Gly Ser Ile Asp Thr Asp Gly
          115          120

```

5

<210> 395

<211> 130

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 395

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro
 20 25 30

Gly Ala Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Thr Ser Gly Phe Ser Phe Ser
 35 40 45

Ser Ser Tyr Phe Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Ala Cys Ile Tyr Gly Gly Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80

Ser Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr
 85 90 95

Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
 100 105 110

Phe Cys Ala Arg Glu Trp Ala Tyr Ser Gln Gly Tyr Phe Gly Ala Phe
 115 120 125

Asp Leu
 130

5 <210> 396
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 396

10 Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Lys Asn Asn Gln Leu Ser
 1 5 10

15 <210> 397
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 397

20 Gly Ala Ser Ala Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 398
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

ES 2 610 607 T3

<400> 398

Ala Gly Ala Ile Thr Gly Ser Ile Asp Thr Asp Gly
 1 5 10

5 <210> 399
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 399

Ser Ser Tyr Phe Ile Cys
 1 5

15 <210> 400
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 400

Cys Ile Tyr Gly Gly Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 1 5 10 15

Gly

25 <210> 401
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 401

Glu Trp Ala Tyr Ser Gln Gly Tyr Phe Gly Ala Phe Asp Leu
 1 5 10

30 <210> 402
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 402

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgtc 60
 acatttgcca togaaatgac ccagagtcca ttctccgtgt ctgcagctgt gggaggcaca 120
 gtcagcatca gttgccaggc cagtcagagt gtttataaga acaaccaatt atcctggtat 180
 cagcagaaat cagggcagcc tcccaagctc ctgatctatg gtgcatcggc tctggcatct 240
 ggggtcccat cgcggttcaa aggcagtgga tctgggacag agttcactct caccatcagc 300
 gacgtgcagt gtgacgatgc tgccacttac tactgtgcag gcgctattac tggtagtatt 360
 gatacggatg gt 372

40 <210> 403
 <211> 390
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

ES 2 610 607 T3

<400> 403

atgggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag	60
tcggttgagg agtccggggg agacctggtc aagcctgggg catccctgac actcacctgc	120
acaacttctg gattctcctt cagtagcagc tacttcattt gctgggtccg ccaggctcca	180
gggaaggggc tggagtggat cgcatgcatt tatggtggtg atggcagcac atactacgag	240
agctgggcga aaggccgatt caccatctcc aaaacctcgt cgaccacggt gacgctgcaa	300
atgaccagtc tgacagccgc ggacacggcc acctatttct gtgcgagaga atgggcatat	360
agtcaaggtt attttgggtgc ttttgatctc	390

5

<210> 404
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10

<400> 404
 caggccagtc agagtgttta taagaacaac caattatcc 39

15

<210> 405
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20

<400> 405
 ggtgcatcgg ctctggcatc t 21

25

<210> 406
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 406
 gcaggcgcta ttactggtag tattgatacg gatggt 36

30

<210> 407
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

35

<400> 407
 agcagctact tcatttgc 18

40

<210> 408
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

45

<400> 408
 tgcatttatg gtggatgatg cagcacatac tacgcgagct gggcgaaagg c 51

50

<210> 409
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 409

ES 2 610 607 T3

gaatgggcat atagtcaagg ttatttgggt gcttttgatc tc 42

<210> 410

<211> 124

5 <212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 410

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
20 25 30

Val Glu Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Glu Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
50 55 60

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val
65 70 75 80

Ser Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys
100 105 110

Thr Tyr Gly Thr Ile Ser Ile Ser Asp Gly Asn Ala
115 120

10

<210> 411

<211> 124

<212> PRT

15 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 411

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 35 40 45

Ser Tyr Phe Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu
 50 55 60

Tyr Ile Gly Phe Ile Asn Pro Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp
 65 70 75 80

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu
 85 90 95

Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 100 105 110

Arg Val Leu Ile Val Ser Tyr Gly Ala Phe Thr Ile
 115 120

5 <210> 412
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 412

Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

15 <210> 413
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 413

20 Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

25 <210> 414
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 414

ES 2 610 607 T3

Gln Cys Thr Tyr Gly Thr Ile Ser Ile Ser Asp Gly Asn Ala
 1 5 10

5 <210> 415
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 415

Ser Tyr Phe Met Thr
 1 5

10 <210> 416
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 15 <400> 416

Phe Ile Asn Pro Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Val Lys Gly
 1 5 10 15

20 <210> 417
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 417

Val Leu Ile Val Ser Tyr Gly Ala Phe Thr Ile
 1 5 10

30 <210> 418
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 35 <400> 418

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 agatgtgatg ttgtgatgac ccagactcca gcctccgtgg aggcagctgt gggaggcaca 120
 gtcaccatca agtgccaggc cagtgaggat attagtagct acttagcctg gtatcagcag 180
 aaaccagggc agcctcccaa gctcctgatc tatgctgcat ccaatctgga atctggggtc 240
 tcatcgcgat tcaaaggcag tggatctggg acagagtaca ctctcaccat cagcgacctg 300
 gagtgtgccg atgctgccac ctattactgt caatgtactt atggtactat ttctattagt 360
 gatggtaatg ct 372

40 <210> 419
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 45 <400> 419

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccaatgtcag 60
 tcggtggagg agtccggggg tcgctgggtc acgcctggga caccctgac actcacctgc 120
 acagtctctg gattctccct cagtagctac ttcatgacct gggtcgccca ggctccaggg 180
 gaggggctgg aatacatcgg attcattaat cctgggtgta gcgcttacta cgcgagctgg 240
 gtgaaaggcc gattcaccat ctccaagtcc tcgaccacgg tagatctgaa aatcaccagt 300
 ccgacaaccg aggacacggc cacctatttc tgtgccaggg ttctgattgt ttcttatgga 360
 gcctttacca tc 372

5 <210> 420
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 420
 caggccagtg aggatattag tagctactta gcc 33

15 <210> 421
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 421
 gctgcatcca atctggaatc t 21

20 <210> 422
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

25 <400> 422
 caatgtactt atggtactat ttctattagt gatgtaatg ct 42

30 <210> 423
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 423
 agctacttca tgacc 15

35 <210> 424
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 424
 ttcattaatc ctgggtgtag cgcttactac gcgagctggg tgaaaggc 48

45 <210> 425
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 425
 gttctgattg ttcttatgg agccttacc ate 33

<210> 426
 <211> 124
 <212> PRT

ES 2 610 607 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 426

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser

          20          25          30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser
          35          40          45

Glu Asp Ile Glu Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
          50          55          60

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val
65          70          75          80

Ser Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
          85          90          95

Ile Ser Asp Leu Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys
          100          105          110

Thr Tyr Gly Ile Ile Ser Ile Ser Asp Gly Asn Ala
          115          120

```

5

<210> 427

<211> 124

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 427

ES 2 610 607 T3

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

115

120

5 <210> 428
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 428

10 Gln Ala Ser Glu Asp Ile Glu Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

15 <210> 429
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 429

20 Gly Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

25 <210> 430
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 430

ES 2 610 607 T3

Gln Cys Thr Tyr Gly Ile Ile Ser Ile Ser Asp Gly Asn Ala
 1 5 10

5 <210> 431
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 431

Ser Tyr Phe Met Thr
 1 5

10 <210> 432
 <211> 16
 <212> PRT
 15 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 432

Phe Met Asn Thr Gly Asp Asn Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

20 <210> 433
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 433

Val Leu Val Val Ala Tyr Gly Ala Phe Asn Ile
 1 5 10

30 <210> 434
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 35 <400> 434

```

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc      60
agatgtgatg ttgtgatgac ccagactcca gcctccgtgt ctgcagctgt gggaggcaca      120
gtcaccatca agtgccaggc cagtgaggac attgaaagct atctagcctg gtatcagcag      180
aaaccagggc agcctcccaa gctcctgatc tatgggtgcat ccaatctgga atctggggtc      240
tcatcgoggt tcaaaggcag tggatctggg acagagttca ctctcaccat cagcgacctg      300
gagtgtgccg atgctgccac ttactattgt caatgcactt atggtattat tagtattagt      360
gatggtaatg ct                                                                372
  
```

40 <210> 435
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 45 <400> 435

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaagggtg ccagtgtcag 60
 tcggtggagg agtccggggg tcgcctggtc acgcctggga caccctgac actcacctgc 120
 acagtgtctg gattctccct cagtagctac ttcacacact gggtccgcca ggctccaggg 180
 gaggggctgg aatacatcgg attcatgaat actggtgata acgcatacta cgcgagctgg 240
 gcgaaaggcc gattcaccat ctocaaaacc tcgaccacgg tggatctgaa aatcaccagt 300
 ccgacaaccg aggacacggc cacctatttc tgtgccaggg ttcttgttgt tgcttatgga 360
 gcctttaaca tc 372

5 <210> 436
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 436
 caggccagtg aggacattga aagctatcta gcc 33

15 <210> 437
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 437
 ggtgcatcca atctggaatc t 21

20 <210> 438
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

25 <400> 438
 caatgcactt atggtattat tagtattagt gatggaatg ct 42

30 <210> 439
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 439
 agctactca tgacc 15

35 <210> 440
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 440
 ttcataata ctggtgataa cgcatactac cgcgagctgg cgaaaggc 48

45 <210> 441
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 441
 gttctgttg ttgcttatgg agccttaac atc 33

<210> 442
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

ES 2 610 607 T3

<400> 442

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro
          20          25          30

Val Ser Glu Pro Val Gly Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ser
          35          40          45

Lys Ser Val Met Asn Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
          50          55          60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65          70          75          80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
          85          90          95

Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
          100          105          110

Gln Gly Gly Tyr Thr Gly Tyr Ser Asp His Gly Thr
          115          120

```

5

<210> 443
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10

<400> 443

ES 2 610 607 T3

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

<210> 444
 <211> 13
 5 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 444

Gln Ser Ser Lys Ser Val Met Asn Asn Asn Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 445
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 445

Gly Ala Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 446
 <211> 12
 20 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 446

Gln Gly Gly Tyr Thr Gly Tyr Ser Asp His Gly Thr
 1 5 10

ES 2 610 607 T3

5 <210> 447
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 447

Ser Tyr Pro Met Asn
 1 5

10 <210> 448
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 15 <400> 448

Phe Ile Asn Thr Gly Gly Thr Ile Val Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

20 <210> 449
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 449

Gly Ser Tyr Val Ser Ser Gly Tyr Ala Tyr Tyr Phe Asn Val
 1 5 10

30 <210> 450
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 450

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 acatttgccg cagtgtgac ccagactcca tctcccggt ctgaacctgt gggaggcaca 120
 gtcagcatca gttgccagtc cagtaagagt gttatgaata acaactactt agcctggtat 180
 cagcagaaac cagggcagcc tcccaagctc ctgatctatg gtgcatccaa tctggcatct 240
 ggggtcccat cacggttcag cggcagtgga tctgggacac agttcactct caccatcagc 300
 gacgtgcagt gtgacgatgc tgccacttac tactgtcaag gcggttatac tggttatagt 360
 35 gatcatggga ct 372

40 <210> 451
 <211> 381
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 451

ES 2 610 607 T3

atgggagactg ggctgcgctg gottctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
 tcggtggagg agtccggggg togcctggtc aagcctgacg aaaccctgac actcacctgc 120
 acagtctctg gaatcgacct cagtagctat ccaatgaact gggcccgcca ggctccaggg 180
 aaggggctgg aatggatcgg attcattaat actgggtgta ccatagtcta cgcgagctgg 240
 gcaaaaggcc gattcaccaat ctccaaaacc togaccacgg tggatctgaa aatgaccagt 300
 ccgacaaccg aggacacggc cacctatttc tgtgccagag gcagttatgt ttcattctggt 360
 tatgcctact attttaatgt c 381

5 <210> 452
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 452
 cagtccagta agagtgtat gaataacaac tacttagcc 39

15 <210> 453
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 453
 ggtgcatcca atctggcatc t 21

20 <210> 454
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

25 <400> 454
 caaggcggtt atactggta tagtgatcat gggact 36

30 <210> 455
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 455
 agctatccaa tgaac 15

35 <210> 456
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 456
 ttcattaata ctgggtgtac catagtctac cgcgagctggg caaaaggc 48

45 <210> 457
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 457
 ggcagttatg tttcatctgg ttatgcctac tattttaatg tc 42

<210> 458
 <211> 121

ES 2 610 607 T3

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 458

5

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro
20 25 30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ser
35 40 45

Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Trp Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Cys Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Ala Gly Gly Tyr Leu Asp Ser Val Ile

115

120

<210> 459

<211> 126

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 459

10

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
35 40 45

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

Trp Ile Gly Ile Ile Ala Asn Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Asn Trp
65 70 75 80

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu
85 90 95

Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
100 105 110

Arg Glu Ser Gly Met Tyr Asn Glu Tyr Gly Lys Phe Asn Ile
115 120 125

5 <210> 460
<211> 13
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 460

10 Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Trp Leu Ser
1 5 10

15 <210> 461
<211> 7
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 461

20 Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

25 <210> 462
<211> 9
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 462

30 Ala Gly Gly Tyr Leu Asp Ser Val Ile
1 5

<210> 463

ES 2 610 607 T3

<211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

5 <400> 463

Thr Tyr Ser Ile Asn
 1 5

10 <210> 464
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

15 <400> 464

Ile Ile Ala Asn Ser Gly Thr Thr Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

20 <210> 465
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 465

25 Glu Ser Gly Met Tyr Asn Glu Tyr Gly Lys Phe Asn Ile
 1 5 10

30 <210> 466
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 466

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 acatttgccg ccgtgctgac ccagactcca tctcccgtgt ctgcagctgt gggaggcaca 120
 gtcagcatca gttgccagtc cagtcagagt gtttataata acaactggtt atcctggttt 180
 cagcagaaac cagggcagcc tccaagctc ctgatctaca aggcattccac tctggcatct 240
 ggggtcccat cgcggttcaa aggcagtgga tctgggacac agttcactct caccatcagc 300
 gacgtgcagt gtgacgatgt tgccacttac tactgtgctg gcggttatct tgatagtgtt 360
 att 363

35

<210> 467
 <211> 378
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40

<400> 467

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
 tcggtggagg agtccggggg tcgcctggtc acgcctggga caccctgac actcaactgc 120
 acagtctctg gattctccct cagtacctat tcaataaact gggtcgcgca ggctccaggg 180
 aagggcctgg aatggatcgg aatcattgct aatagtggta ccacattcta cgcgaactgg 240
 gcgaaaggcc gattcaccgt ctccaaaacc tcgaccacgg tggatctgaa aatcaccagt 300
 ccgacaaccg aggacacggc cacctatttc tgtgccagag agagtggaat gtacaatgaa 360
 tatggtaaat ttaacatc 378

5 <210> 468
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 468
 cagccagtc agagtgtta taataacaac tggttatcc 39

15 <210> 469
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 469
 aaggcatcca ctctggcatc t 21

25 <210> 470
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 470
 gcgggcgggt atctgatag tgttatt 27

35 <210> 471
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 471
 acctattcaa taaac 15

45 <210> 472
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 472
 atcattgcta atagtgttac cacattctac gcgaactggg cgaaaggc 48

<210> 473
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 473
 gagagtggaa tgtacaatga atatggtaaa ttaacatc 39

<210> 474
 <211> 122
 <212> PRT

ES 2 610 607 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 474

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ser Asp Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser
          20          25          30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser
          35          40          45

Glu Asn Ile Tyr Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
          50          55          60

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
65          70          75          80

Ser Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr
          85          90          95

Ile Ser Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
          100          105          110

Gly Ala Thr Val Tyr Asp Ile Asp Asn Asn
          115          120

```

5

<210> 475

<211> 128

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 475

```

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1          5          10          15

```


ES 2 610 607 T3

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

5 <210> 476
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 476

10 Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Phe Leu Ala
 1 5 10

15 <210> 477
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 477

20 Lys Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 478
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 478

30 Gln Gln Gly Ala Thr Val Tyr Asp Ile Asp Asn Asn
 1 5 10

<210> 479
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

ES 2 610 607 T3

<400> 479

Ala Tyr Ala Met Ile
1 5

5

<210> 480
<211> 16
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

10

<400> 480

Ile Ile Tyr Pro Asn Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

15

<210> 481
<211> 15
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

20

<400> 481

Asp Ala Glu Ser Ser Lys Asn Ala Tyr Trp Gly Tyr Phe Asn Val
1 5 10 15

25

<210> 482
<211> 366
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

30

<400> 482

atggacacga	gggccccac	tcagctgctg	gggctcctgc	tgctctggct	cccaggtgcc	60
agatgtgcct	ctgatatgac	ccagactcca	tcctccgtgt	ctgcagctgt	gggaggcaca	120
gtcaccatca	attgccaggc	cagtgagaac	atztatagct	tttggcctg	gtatcagcag	180
aaaccagggc	agcctcccaa	gctcctgac	ttcaaggctt	ccactctggc	atctggggtc	240
tcatcgcggt	tcaaaggcag	tggatctggg	acacagttca	ctctcaccat	cagcgacctg	300
gagtgtgacg	atgctgccac	ttactactgt	caacagggtg	ctactgtgta	tgatattgat	360
aataat						366

35

<210> 483
<211> 384
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 483

ES 2 610 607 T3

	atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag	60
	tcgctggagg agtccggggg tcgcctggtc acgcctggga cacccctgac actcacctgc	120
	acagtttctg gaatcgacct cagtgcctat gcaatgatct gggccgcca ggctccaggg	180
	gaggggctgg aatggatcac aatcatttat cctaattgta tcacatacta cgcgaactgg	240
	gcgaaaggcc gattcacctg ctocaaaacc tcgaccgca tggatctgaa aatcaccagt	300
	ccgacaaccg aggacacggc cacctatttc tgtgccagag atgcagaaag tagtaagaat	360
	gcttattggg gctactttaa cgtc	384
5	<210> 484 <211> 33 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
10	<400> 484 caggccagtg agaacatta tagcttttg gcc	33
15	<210> 485 <211> 21 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	<400> 485 aaggctcca ctctggcatc t	21
20	<210> 486 <211> 36 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
25	<400> 486 caacagggtg ctactgtga tgatattgat aataat	36
30	<210> 487 <211> 15 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	<400> 487 gcctatgcaa tgatc	15
35	<210> 488 <211> 48 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
40	<400> 488 atcatttat ctaatggat cacatactac gcgaactggg cgaaaggc	48
45	<210> 489 <211> 45 <212> ADN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
50	<400> 489 gatgcagaaa gtagtaagaa tgcttattgg ggctacttta acgtc	45
	<210> 490 <211> 122	

ES 2 610 607 T3

<212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 490

5

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ser Asp Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser
          20          25          30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser
          35          40          45

Glu Asn Ile Tyr Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
          50          55          60

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
65          70          75          80

Ser Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr
          85          90          95

Ile Ser Asp Leu Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
          100          105          110

Gly Ala Thr Val Tyr Asp Ile Asp Asn Asn
          115          120
  
```

<210> 491
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10

<400> 491

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser
 35 40 45

Ala Tyr Ala Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Ile Thr Ile Ile Tyr Pro Asn Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp
 65 70 75 80

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Lys Thr Ser Thr Ala Met Asp Leu
 85 90 95

Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 100 105 110

Arg Asp Ala Glu Ser Ser Lys Asn Ala Tyr Trp Gly Tyr Phe Asn Val
 115 120 125

<210> 492
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 492

Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Phe Leu Ala
 1 5 10

<210> 493
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 493

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

<210> 494
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 494

Gln Gln Gly Ala Thr Val Tyr Asp Ile Asp Asn Asn
 1 5 10

ES 2 610 607 T3

5 <210> 495
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 495

Ala Tyr Ala Met Ile
 1 5

10 <210> 496
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 15 <400> 496

Ile Ile Tyr Pro Asn Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

20 <210> 497
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 497

Asp Ala Glu Ser Ser Lys Asn Ala Tyr Trp Gly Tyr Phe Asn Val
 1 5 10 15

30 <210> 498
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 35 <400> 498

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 agatgtgcct ctgatatgac ccagactcca tcctcogtgt ctgcagctgt gggaggcaca 120
 gtcacccatca attgccaggc cagtgagaac atttatagct ttttggcctg gtatcagcag 180
 aaaccagggc agcctcccaa gctcctgatc ttcagggctt ccactctggc atctggggtc 240
 tcatcgcggt tcaaaggcag tggatctggg acacagttca ctctcaccat cagcgacctg 300
 gagtgtgacg atgctgccac ttactactgt caacaggggtg ctactgtgta tgatattgat 360
 aataat 366

40 <210> 499
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 499

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gottctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
 tegetggagg agtcggggg togcctggtc acgcctggga caccctgac actcacctgc 120
 acagtttctg gaatcgacct cagtgcctat gcaatgatct gggcccgcca ggctccaggg 180
 gaggggctgg aatggatcac aatcatttat cctaattgta tcacatacta cgcgaaactgg 240
 gcgaaaaggcc gattcacctg ctocaaaacc togaccgca tggatctgaa aatcaccagt 300
 ccgacaaccg aggacacggc cacctatttc tgtgccagag atgcagaaag tagtaagaat 360
 gcttattggg gctactttaa cgtc 384

5 <210> 500
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 500
 caggccagtg agaacattta tagcttttg gcc 33

15 <210> 501
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 501
 agggctcca ctctggcatc t 21

25 <210> 502
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 502
 caacagggtg ctactgtgta tgatattgat aataat 36

35 <210> 503
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 503
 gcctatgcaa tgatc 15

45 <210> 504
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 504
 atcatttat ctaatggat cacatactac gcgaactggg cgaaaggc 48

55 <210> 505
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

60 <400> 505
 gatgcagaaa gtagtaagaa tgcttattgg ggctacttta acgtc 45

65 <210> 506
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

ES 2 610 607 T3

<400> 506

```

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

```

5

<210> 507
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10

<400> 507

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn
 35 40 45

Arg Asn Ser Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Ile Gly Ile Ile Thr Gly Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp
 65 70 75 80

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu
 85 90 95

Lys Met Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 100 105 110

Arg Gly His Pro Gly Leu Gly Ser Gly Asn Ile
 115 120

5 <210> 508
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 508

10 Gln Ala Ser Glu Ser Val Phe Asn Asn Met Leu Ser
 1 5 10

15 <210> 509
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 509

20 Asp Ala Ser Asp Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 510
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 510

Ala Gly Tyr Lys Ser Asp Ser Asn Asp Gly Asp Asn Val
 1 5 10

ES 2 610 607 T3

5 <210> 511
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 511

Arg Asn Ser Ile Thr
 1 5

10 <210> 512
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 15 <400> 512

Ile Ile Thr Gly Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15

20 <210> 513
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 513

Gly His Pro Gly Leu Gly Ser Gly Asn Ile
 1 5 10

30 <210> 514
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 514

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 acatttgcca ttgaaatgac ccagactcca tcccccggtg ctgcegetgt gggaggcaca 120
 gtcaccatca attgccaggc cagtgagagt gtttttaata atatggtatc ctggtatcag 180
 cagaaaccag ggcactctcc taagctcctg atctatgatg catccgatct ggcactctggg 240
 gtcccatcgc ggtcaaagg cagtggatct gggacacagt tcactctcac catcagtggc 300
 gtggagtgtg acgatgctgc cacttactat tgtgcagggt ataaaagtga tagtaatgat 360
 35 ggcgataatg tt 372

40 <210> 515
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 515

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
 tcgctggagg agtccggggg tcgcctggtc acgcctggga caccctgac actcacctgc 120
 acagtctctg gattctccct caacaggaat tcaataacct gggtcgcca ggctccaggg 180
 gaggggctgg aatggatcgg aatcattact ggtagtggta gaacgtacta cgcgaactgg 240
 gcaaaaggcc gattcaccat ctccaaaacc tcgaccacgg tggatctgaa aatgaccagt 300
 ccgacaaccg aggacacggc cacctatttc tgtgccagag gccatcctgg tcttggtagt 360
 ggtaacatc 369

5 <210> 516
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 516
 caggccagtg agagtgttt taataatg ttatcc 36

15 <210> 517
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 517
 gatgcatccg atctggcatc t 21

25 <210> 518
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 518
 gcagggtata aaagtgatag taatgatggc gataatgtt 39

35 <210> 519
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 519
 aggaattcaa taacc 15

45 <210> 520
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 520
 atcattactg gtagtgtag aacgtactac gcgaactggg caaaaggc 48

55 <210> 521
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

60 <400> 521
 ggccatcctg gtcttgtag tggtaacatc 30

65 <210> 522
 <211> 121
 <212> PRT

ES 2 610 607 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 522

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Ala Ser Ser
          20          25          30

Val Ser Ala Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser
          35          40          45

Gln Ser Val Tyr Asn Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
          50          55          60

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Ala Ser Ser Leu Ala Ser Gly
65          70          75          80

Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu
          85          90          95

Thr Ile Ser Glu Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
          100          105          110

Gly Tyr Tyr Ser Gly Pro Ile Ile Thr
          115          120

```

5

<210> 523

<211> 122

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 523

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn
 35 40 45

Asn Tyr Tyr Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Ile Gly Ile Ile Tyr Ala Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Thr Trp
 65 70 75 80

Ala Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ala Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Asp
 85 90 95

Leu Lys Met Thr Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 100 105 110

Ala Arg Gly Thr Phe Asp Gly Tyr Glu Leu
 115 120

5 <210> 524
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 524

10 Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Tyr Leu Ser
 1 5 10

15 <210> 525
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 525

20 Thr Ala Ser Ser Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 526
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 526

Gln Gly Tyr Tyr Ser Gly Pro Ile Ile Thr
 1 5 10

ES 2 610 607 T3

5 <210> 527
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 527

Asn Tyr Tyr Ile Gln
 1 5

10 <210> 528
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 15 <400> 528

Ile Ile Tyr Ala Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Asn Gly
 1 5 10 15

20 <210> 529
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25 <400> 529

Gly Thr Phe Asp Gly Tyr Glu Leu
 1 5

30 <210> 530
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 530

	atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc	60
	acatttgccg aagtgctgac ccagactgca tcgtccgtgt ctgcagctgt gggaggcaca	120
	gtcaccatca attgccagtc cagtcagagt gtttataata actactatc ctggtatcag	180
	cagaaaccag ggcagcctcc caagctcctg atctatactg catccagcct ggcactctggg	240
	gtcccatcgc ggttcaaagg cagtggatct gggacacagt tcactctcac catcagcgaa	300
	gtgcagtgctg acgatgctgc cacttactac tgtcaaggct attatagtgg tcctataatt	360
35	act	363

40 <210> 531
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 <400> 531

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
 tcgctggagg agtccggggg tcgcctggtc acgcctggga caccctgac actcacctgc 120
 acagcctctg gattctccct caataactac tacatataat ggggccgcca ggctccaggg 180
 gaggggctgg aatggatcgg gatcatttat gctggtggtg ggcataacta cgcgacctgg 240
 gcaaacggcc gattcacat cgccaaaacc tcgtcgacca cggtgatct gaagatgacc 300
 agtctgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gagggacatt tgatggttat 360
 gagttg 366

5 <210> 532
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 532
 cagtcagtc agagtgtta taataactac ttatcc 36

15 <210> 533
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 533
 actgcatcca gctggcatc t 21

25 <210> 534
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 534
 caaggctatt atagtggtcc tataattact 30

35 <210> 535
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 535
 aactactaca taaa 15

45 <210> 536
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 536
 atcatttatg ctggtggtag cgcatactac ggcacctggg caaacggc 48

55 <210> 537
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

60 <400> 537
 gggacattg atggtatga gttg 24

65 <210> 538
 <211> 122
 <212> PRT

ES 2 610 607 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 538

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro
          20          25          30

Val Ser Val Pro Val Gly Asp Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser
          35          40          45

Glu Ser Val Tyr Ser Asn Asn Leu Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
          50          55          60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
65          70          75          80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr
          85          90          95

Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
          100          105          110

          Gln Gly Tyr Tyr Ser Gly Val Ile Asn Ser
          115          120

```

5

<210> 539

<211> 124

<212> PRT

10 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 539

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 35 40 45

Ser Tyr Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu
 50 55 60

Tyr Ile Gly Phe Ile Asn Pro Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp
 65 70 75 80

Ala Ser Gly Arg Leu Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu
 85 90 95

Lys Ile Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 100 105 110

Arg Ile Leu Ile Val Ser Tyr Gly Ala Phe Thr Ile
 115 120

5 <210> 540
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 540
 Gln Ser Ser Glu Ser Val Tyr Ser Asn Asn Leu Leu Ser
 1 5 10

15 <210> 541
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 541
 Arg Ala Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 542
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 542
 Gln Gly Tyr Tyr Ser Gly Val Ile Asn Ser
 1 5 10

<210> 543

ES 2 610 607 T3

<211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

5 <400> 543

Ser Tyr Phe Met Ser
 1 5

10 <210> 544
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

15 <400> 544

Phe Ile Asn Pro Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Ser Gly
 1 5 10 15

20 <210> 545
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 545

25 Ile Leu Ile Val Ser Tyr Gly Ala Phe Thr Ile
 1 5 10

30 <210> 546
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 546

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 acatttgccc aagtgctgac ccagactcca tcccctgtgt ctgtccctgt gggagacaca 120
 gtcaccatca gttgccagtc cagtgagagc gtttatagta ataacctctt atcctggtat 180
 cagcagaaac cagggcagcc tcccagctc ctgatctaca gggcatccaa tctggcatct 240
 ggtgtcccat cgcggttcaa aggcagtgga tctgggacac agttcactct caccatcagc 300
 ggcgcacagt gtgacgatgc tgccacttac tactgtcaag gctattatag tggtgtcatt 360
 aatagt 366

35 <210> 547
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 547

ES 2 610 607 T3

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag 60
 tcggtggagg agtccggggg tcgcctggtc acgcctggga caccctgac actcacctgc 120
 acagtgtctg gattctccct cagtagctac ttcattgagct gggcccgcca ggctccaggg 180
 gaggggctgg aatacatcgg attcattaat cctgggtgga gcgcatacta cgcgagctgg 240
 gcgagtggcc gactcaccat ctccaaaacc tcgaccacgg tagatctgaa aatcaccagt 300
 ccgacaaccg aggacacggc cacctatttc tgtgccagga ttcttattgt ttcttatgga 360
 gcctttacca tc 372

5 <210> 548
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 548
 cagtcagtg agagcgttta tagtaataac ctctatcc 39

15 <210> 549
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 549
 agggcatcca atctggcatc t 21

20 <210> 550
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

25 <400> 550
 caaggctatt atagtggtgt cattaatagt 30

30 <210> 551
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 551
 agctactca tgagc 15

35 <210> 552
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 552
 ttcattaatc ctggtgtag cgcatactac gcgagctggg cgagtggc 48

45 <210> 553
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 553
 attctattg ttcttatgg agccttacc atc 33

<210> 554
 <211> 122
 <212> PRT

ES 2 610 607 T3

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 554

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

5

<210> 555

<211> 128

<212> PRT

10

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 555

ES 2 610 607 T3

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15

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

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 35 40 45

Lys Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Lys
 50 55 60

Tyr Ile Gly Tyr Ile Asp Ser Thr Thr Val Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr
 65 70 75 80

Trp Ala Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp
 85 90 95

Leu Lys Ile Thr Ser Pro Thr Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 100 105 110

Ala Arg Gly Ser Thr Tyr Phe Thr Asp Gly Gly His Arg Leu Asp Leu
 115 120 125

5 <210> 556
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 556

10 Gln Ala Thr Glu Ser Ile Gly Asn Glu Leu Ser
 1 5 10

15 <210> 557
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 557

20 Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 558
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 558

ES 2 610 607 T3

Gln Gln Gly Tyr Ser Ser Ala Asn Ile Asp Asn Ala

1 5 10

5 <210> 559
<211> 5
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 559

Lys Tyr Tyr Met Ser
1 5

10
15 <210> 560
<211> 17
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 560

Tyr Ile Asp Ser Thr Thr Val Asn Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Ala Arg
1 5 10 15

Gly

20
25 <210> 561
<211> 14
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 561

Gly Ser Thr Tyr Phe Thr Asp Gly Gly His Arg Leu Asp Leu
1 5 10

30 <210> 562
<211> 366
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

35 <400> 562

```

atggacaaga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc      60
agatgtgcct atgatatgac ccagactcca gcctctgtgg aggtagctgt gggaggcaca      120
gtcaccatca agtgccaggc cactgagagc attggcaatg agttatcctg gtatcagcag      180
aaaccagggc aggctcccaa gctcctgata tattctgcat ccactctggc atctggggtc      240
ccatcgcggt tcaaaggcag tggatctggg acacagttca ctctcaccat caccggcgtg      300
gagtgtgatg atgctgccac ttaactactgt caacaggggt atagtagtgc taatattgat      360
aatgct                                           366
    
```

40 <210> 563
<211> 384

ES 2 610 607 T3

<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 563

5

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgtcag	60
tcgctggagg agtccggggg tcgcctggtc acgcctggga caccctgac actcacctgc	120
accgtctctg gattctccct cagtaagtac tacatgagct ggtccgcca ggctccagag	180
aaggggctga aatacatcgg atacattgat agtactactg ttaatacata ctacggacc	240
tgggcgagag gccgattcac catctccaaa acctcgacca cggtgatct gaagatcacc	300
agtccgacaa gtgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gaggaagtac ttattttact	360
gatggaggcc atcggttga tctc	384

<210> 564
<211> 33
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

10

<400> 564
caggccactg agagcattgg caatgagta tcc 33

15

<210> 565
<211> 21
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

20

<400> 565
tctgcatcca ctctggcatc t 21

25

<210> 566
<211> 36
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

30

<400> 566
caacagggtt atagtagtgc taatattgat aatgct 36

35

<210> 567
<211> 15
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 567
aagtactaca tgagc 15

40

<210> 568
<211> 51
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

45

<400> 568
tacattgata gtactactgt taatacatac tacgcgacct gggcgagagg c 51

50

<210> 569
<211> 42
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 569

ES 2 610 607 T3

ggaagtactt attttactga tggaggccat cggttggatc tc 42

5 <210> 570
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 570

```

Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser
          20          25          30

Val Glu Val Ala Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Thr
          35          40          45

Glu Ser Ile Gly Asn Glu Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
          50          55          60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val
65          70          75          80

Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr
          85          90          95

Ile Thr Gly Val Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
          100          105          110

Gly Tyr Ser Ser Ala Asn Ile Asp Asn Ala
          115          120
  
```

15 <210> 571
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 571

```

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
1          5          10          15

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

20

ES 2 610 607 T3

Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
 35 40 45

Thr Tyr Asn Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Ile Gly Ser Ile Thr Ile Asp Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
 65 70 75 80

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Lys Ser Ser Thr Thr Val Asp Leu
 85 90 95

Lys Met Thr Ser Leu Thr Thr Gly Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 100 105 110

Arg Ile Leu Ile Val Ser Tyr Gly Ala Phe Thr Ile
 115 120

5 <210> 572
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 572

10 Gln Ala Thr Glu Ser Ile Gly Asn Glu Leu Ser
 1 5 10

15 <210> 573
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 573

20 Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

25 <210> 574
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 574

30 Gln Gln Gly Tyr Ser Ser Ala Asn Ile Asp Asn Ala
 1 5 10

35 <210> 575
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 575

ES 2 610 607 T3

Thr Tyr Asn Met Gly
1 5

5 <210> 576
<211> 16
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 576

10 Ser Ile Thr Ile Asp Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

15 <210> 577
<211> 11
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 577

20 Ile Leu Ile Val Ser Tyr Gly Ala Phe Thr Ile
1 5 10

25 <210> 578
<211> 366
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 578

```

atggacacga gggcccccac tcagctgctg gggctcctgc tgetctggct cccaggtgcc      60
agatgtgcct atgatatgac ccagactcca gcctctgtgg aggtagctgt gggaggcaca      120
gtcaccatca agtgccaggc cactgagagc attggcaatg agttatcctg gtatcagcag      180
aaaccagggc aggctcccaa gctcctgata tattctgcat ccaactctggc atctggggtc      240
ccatcgcggg tcaaaggcag tggatctggg acacagttca ctctcaccat caccggcgtg      300
gagtgtgatg atgctgccac ttactactgt caacagggtt atagtagtgc taatattgat      360
aatgct                                           366
    
```

30 <210> 579
<211> 372
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

35 <400> 579

```

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaagggtg ccagtgtcag      60
tcgctggagg agtccggggg tcgcctggta acgcctggga caccctgac actcacctgc      120
acagtctctg gattctccct cagtacctac aacatgggct gggctcgcca ggctccaggg      180
aaggggctgg aatggatcgg aagtattact attgatggtc gcacatacta cgcgagctgg      240
    
```

ES 2 610 607 T3

gcgaaaggcc gattcaccgt ctccaaaagc tgcaccacgg tggatctgaa aatgaccagt 300

ctgacaaccg gggacacggc cacctatttc tgtgccagga ttcttattgt ttcttatggg 360

gcctttacca tc 372

5 <210> 580
<211> 33
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

10 <400> 580
caggccactg agagcattgg caatgagta tcc 33

15 <210> 581
<211> 21
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

20 <400> 581
tctgcatcca ctctggcatc t 21

25 <210> 582
<211> 36
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

30 <400> 582
caacagggtt atagtagtgc taatattgat aatgct 36

35 <210> 583
<211> 15
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

40 <400> 583
acctacaaca tgggc 15

45 <210> 584
<211> 48
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

50 <400> 584
agtattacta ttgatgtcg cacatactac gcgagctggg cgaaaggc 48

55 <210> 585
<211> 33
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

60 <400> 585
attcttattg ttcttatgg ggccttacc atc 33

65 <210> 586
<211> 105
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

70 <220>
<223> Dominio constante kappa de Ab1

75 <400> 586

ES 2 610 607 T3

```

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
1           5           10           15

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
          35           40           45

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
          50           55           60

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
65           70           75           80

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
          85           90           95

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          100          105

```

5 <210> 587
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Dominio constante kappa de Ab1
 <400> 587

```

gtggctgcac catctgtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact      60
gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt acagtggaag      120
gtggataacg cctccaatc gggttaactcc caggagagtg tcacagagca ggacagcaag      180
gacagcacct acagcctcag cagcacctcg acgctgagca aagcagacta cgagaaacac      240
aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag ggctgagct cgcccgtcac aaagagcttc      300
aacaggggag agtgtt                                     315

```

15 <210> 588
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Dominio constant Gamma 1 de Ab1
 <400> 588

ES 2 610 607 T3

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser 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

Arg 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 Ala 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 Glu Glu
225 230 235 240

ES 2 610 607 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 589
 <211> 990
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Gamma-1 constant domain of Ab1

10 <400> 589

gctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggacacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 120
 tggaaactcag ggcgccctgac cagcggcgctg cacacottcc cggtgtctct acagtctctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 300
 aatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 420
 gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacgcc 540
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag 720
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840

ES 2 610 607 T3

ctggactcgg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

5 <210> 590
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 590

10 Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg
 1 5 10 15

15 <210> 591
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 591

20 Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu
 1 5 10 15

25 <210> 592
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 592

30 Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr Ser Ser
 1 5 10 15

35 <210> 593
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 593

40 Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile
 1 5 10 15

45 <210> 594
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 594

50 Pro His Arg Gln Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln
 1 5 10 15

55 <210> 595
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 610 607 T3

<400> 595

Gln Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr
 1 5 10 15

5

<210> 596
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 596

Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp
 1 5 10 15

15

<210> 597
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 597

Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile Ser
 1 5 10 15

25

<210> 598
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

<400> 598

Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg
 1 5 10 15

35

<210> 599
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 599

Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr
 1 5 10 15

40

<210> 600
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45

<400> 600

Ile Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys
 1 5 10 15

50

<210> 601
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55

ES 2 610 607 T3

<400> 601

Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met
 1 5 10 15

5 <210> 602
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 602

Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser
 1 5 10 15

15 <210> 603
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 603

Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu
 1 5 10 15

25 <210> 604
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 604

30 Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala
 1 5 10 15

35 <210> 605
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 605

40 Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn
 1 5 10 15

45 <210> 606
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 606

50 Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu
 1 5 10 15

55 <210> 607
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 607

ES 2 610 607 T3

		Ser	Lys	Glu	Ala	Leu	Ala	Glu	Asn	Asn	Leu	Asn	Leu	Pro	Lys	Met
		1				5					10					15
5		<210> 608 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>														
10		<400> 608														
		Ala	Leu	Ala	Glu	Asn	Asn	Leu	Asn	Leu	Pro	Lys	Met	Ala	Glu	Lys
		1				5					10					15
15		<210> 609 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>														
		<400> 609														
20		Glu	Asn	Asn	Leu	Asn	Leu	Pro	Lys	Met	Ala	Glu	Lys	Asp	Gly	Cys
		1				5					10					15
25		<210> 610 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>														
		<400> 610														
30		Leu	Asn	Leu	Pro	Lys	Met	Ala	Glu	Lys	Asp	Gly	Cys	Phe	Gln	Ser
		1				5					10					15
35		<210> 611 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>														
		<400> 611														
40		Pro	Lys	Met	Ala	Glu	Lys	Asp	Gly	Cys	Phe	Gln	Ser	Gly	Phe	Asn
		1				5					10					15
45		<210> 612 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>														
		<400> 612														
50		Ala	Glu	Lys	Asp	Gly	Cys	Phe	Gln	Ser	Gly	Phe	Asn	Glu	Glu	Thr
		1				5					10					15
55		<210> 613 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>														
		<400> 613														

ES 2 610 607 T3

Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val
 1 5 10 15

5 <210> 614
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 614

Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile
 1 5 10 15

10 <210> 615
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 615

Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu
 1 5 10 15

20 <210> 616
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 616

Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe
 1 5 10 15

30 <210> 617
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 617

Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr
 1 5 10 15

40 <210> 618
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 618

Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr
 1 5 10 15

50 <210> 619
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 619

ES 2 610 607 T3

	Thr	Gly	Leu	Leu	Glu	Phe	Glu	Val	Tyr	Leu	Glu	Tyr	Leu	Gln	Asn
	1				5					10					15
5	<210> 620 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 620														
10	Leu	Glu	Phe	Glu	Val	Tyr	Leu	Glu	Tyr	Leu	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu
	1				5					10					15
15	<210> 621 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 621														
20	Glu	Val	Tyr	Leu	Glu	Tyr	Leu	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Ser	Glu
	1				5					10					15
25	<210> 622 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 622														
30	Leu	Glu	Tyr	Leu	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Ser	Glu	Glu	Gln	Ala
	1				5					10					15
35	<210> 623 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 623														
40	Leu	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Ser	Glu	Glu	Gln	Ala	Arg	Ala	Val
	1				5					10					15
45	<210> 624 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 624														
50	Arg	Phe	Glu	Ser	Ser	Glu	Glu	Gln	Ala	Arg	Ala	Val	Gln	Met	Ser
	1				5					10					15
	<210> 625 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>														

ES 2 610 607 T3

<400> 625

Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val
 1 5 10 15

5 <210> 626
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 626

Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln
 1 5 10 15

15 <210> 627
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 627

Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln
 1 5 10 15

25 <210> 628
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 628

Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala
 1 5 10 15

30 <210> 629
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 629

Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu
 1 5 10 15

40 <210> 630
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 630

Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile
 1 5 10 15

50 <210> 631
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

55 <400> 631

ES 2 610 607 T3

	Phe	Leu	Gln	Lys	Lys	Ala	Lys	Asn	Leu	Asp	Ala	Ile	Thr	Thr	Pro
	1				5					10					15
5	<210> 632 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>														
10	<400> 632														
	Lys	Lys	Ala	Lys	Asn	Leu	Asp	Ala	Ile	Thr	Thr	Pro	Asp	Pro	Thr
	1				5					10					15
15	<210> 633 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>														
	<400> 633														
20	Lys	Asn	Leu	Asp	Ala	Ile	Thr	Thr	Pro	Asp	Pro	Thr	Thr	Asn	Ala
	1				5					10					15
25	<210> 634 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>														
	<400> 634														
30	Asp	Ala	Ile	Thr	Thr	Pro	Asp	Pro	Thr	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu
	1				5					10					15
35	<210> 635 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>														
	<400> 635														
40	Thr	Thr	Pro	Asp	Pro	Thr	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu	Thr	Lys	Leu
	1				5					10					15
45	<210> 636 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>														
	<400> 636														
50	Asp	Pro	Thr	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu	Thr	Lys	Leu	Gln	Ala	Gln
	1				5					10					15
	<210> 637 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>														
	<400> 637														

ES 2 610 607 T3

	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu	Thr	Lys	Leu	Gln	Ala	Gln	Asn	Gln	Trp
	1				5					10					15
5	<210> 638 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>														
	<400> 638														
10	Ser	Leu	Leu	Thr	Lys	Leu	Gln	Ala	Gln	Asn	Gln	Trp	Leu	Gln	Asp
	1				5					10					15
15	<210> 639 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>														
	<400> 639														
20	Thr	Lys	Leu	Gln	Ala	Gln	Asn	Gln	Trp	Leu	Gln	Asp	Met	Thr	Thr
	1				5					10					15
25	<210> 640 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>														
	<400> 640														
30	Gln	Ala	Gln	Asn	Gln	Trp	Leu	Gln	Asp	Met	Thr	Thr	His	Leu	Ile
	1				5					10					15
35	<210> 641 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>														
	<400> 641														
40	Asn	Gln	Trp	Leu	Gln	Asp	Met	Thr	Thr	His	Leu	Ile	Leu	Arg	Ser
	1				5					10					15
45	<210> 642 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>														
	<400> 642														
50	Leu	Gln	Asp	Met	Thr	Thr	His	Leu	Ile	Leu	Arg	Ser	Phe	Lys	Glu
	1				5					10					15
55	<210> 643 <211> 15 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>														
	<400> 643														

ES 2 610 607 T3

Met Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln
 1 5 10 15

5
 <210> 644
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 644

His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu
 1 5 10 15

10
 15
 <210> 645
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 645

Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu
 1 5 10 15

20
 25
 <210> 646
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 646

Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met
 1 5 10 15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-IL6 o fragmento de anticuerpo del mismo que comprende (i) una región variable de cadena ligera (V_L) que comprende un polipéptido CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, un polipéptido CDR2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y un polipéptido CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y (ii) una región variable de la cadena pesada (V_H) que comprende un polipéptido CDR1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, un polipéptido CDR2 que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 120, y un polipéptido CDR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, donde el anticuerpo o fragmento del mismo tiene una constante de disociación (KD) de menos de 50 picomolar según se evalúa por Biacore.
2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1,
- que está aglucosilado,
 - que contiene una región Fc que se ha modificado para alterar su función efectora, semivida, proteólisis, y/o glucosilación,
 - que es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena sencilla o un anticuerpo quimérico,
 - que es un anticuerpo humanizado se deriva de un anticuerpo anti-IL-6 humana de conejo,
 - que se une específicamente a la IL-6 expresada en células humanas y/o moléculas de IL-6 solubles circulantes in vivo,
 - que se une específicamente a una IL-6 que se expresa en o por células humanas en un paciente con una enfermedad en la que los niveles de IL-6 están elevados.
donde la enfermedad se selecciona de entre fatiga general, fatiga inducida por el ejercicio, fatiga relacionada con el cáncer, fatiga relacionada con enfermedades inflamatorias, síndrome de fatiga crónica, caquexia relacionada con el cáncer, caquexia relacionada con enfermedades cardíacas, caquexia relacionada con enfermedades respiratorias, caquexia relacionada con enfermedades renales, caquexia relacionada con la edad, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES), artritis idiopática sistémica juvenil, psoriasis, artropatía psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), polimialgia reumática, arteritis de células gigantes, vasculitis autoinmunitaria, enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD), síndrome de Sjögren, enfermedad de Still de aparición en el adulto, osteoartritis, osteoporosis, enfermedad de Paget del hueso, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de células renales, enfermedad multicéntrica de Castleman, cáncer ovárico, resistencia a fármacos en quimioterapia del cáncer, toxicidad a la quimioterapia en el cáncer, enfermedad isquémica cardíaca, aterosclerosis, obesidad, diabetes, asma, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad cerebrovascular, fiebre, respuesta de fase aguda, alergias, anemia, anemia de inflamación (anemia de enfermedad crónica), hipertensión, depresión, depresión asociada con enfermedad crónica, trombosis, trombocitosis, fallo cardíaco agudo, síndrome metabólico, aborto natural, prostatitis crónica, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria pélvica, lesión por reperfusión, rechazo de implantes, gripe aviar, varicela, gripe pandémica, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), síndrome respiratorio agudo severo (SARS), sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), un cáncer, un trastorno inflamatorio, un trastorno vírico, un trastorno autoinmunitario, artritis, caquexia, y síndrome debilitante.
 - es está unido directa o indirectamente a un marcador detectable o un agente terapéutico,
 - donde dicho anticuerpo quimérico de la reivindicación 2(c) comprende un Fc humano que se selecciona de entre IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgG5, IgG6, IgG7, IgG8, IgG9, IgG10, IgG11, IgG12, IgG13, IgG14, IgG15, IgG16, IgG17, IgG18, IgG19,
 - donde dicho anticuerpo se une al menos a uno de IL-6 soluble, IL-6 expresado en la superficie celular, complejos IL-6/IL-6R, IL-6/IL-6R/gp130 y/o multímeros de los mismos.
 - donde las regiones V_H y V_L contenidas en dicho anticuerpo se originan de una o más poblaciones de células B de conejo,
 - donde dicho anticuerpo no tiene especificidad de unión por IL-6R soluble (sIL-6R) o gp130,
 - donde dicho anticuerpo inhibe la asociación de IL-6 con IL-6R, y/o la producción de complejos IL-6/IL-6R/gp130 y/o la producción de multímeros IL-6/IL-6R/gp130,
 - donde dicho fragmento se selecciona de entre un fragmento Fab, fragmento Fab' o fragmento F(ab')₂,
 - donde dicho anticuerpo comprende además un resto efector que se selecciona de entre
 - un resto detectable seleccionado de entre un colorante fluorescente, una enzima, un sustrato, un material bioluminiscente, un material radioactivo, o un material quimioluminiscente, o
 - un resto funcional que se selecciona de entre estreptavidina, avidina, biotina, una citotoxina, un agente citotóxico, o un material radioactivo,
 - donde dicho anticuerpo antagoniza los efectos biológicos de una o más IL-6 soluble, IL-6 expresada en la superficie celular, complejos IL-6/IL-6R, IL-6/IL-6R/gp130 y/o complejos multímeros IL-6/IL-6R/gp130,
 - donde dicho anticuerpo se une a un epítipo de IL-6 lineal o conformacional,
 - que es un anticuerpo de cadena sencilla que se selecciona de entre scFv, camelicuerpos, nanocuerpos, IgNAR, SMIP, y combinaciones de los mismos.

3. Un anticuerpo anti-IL6 o fragmento de anticuerpo del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una cadena V_L y una cadena V_H , respectivamente que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:18; SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:18; o SEQ ID NO:20 y SEQ ID NO:19, o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo que comprende una cadena V_L y una cadena V_H , respectivamente, que comprenden secuencias de aminoácidos que tienen al menos un 90 % o más de homología con estas.
4. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IL-6 humana o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 3.
5. Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 4.
6. Una célula recombinante que expresa un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 3.
7. Una composición farmacéutica o diagnóstica que contiene al menos un anticuerpo IL-6 o un fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. La composición farmacéutica o diagnóstico de la reivindicación 7,
- a) que comprende al menos un estabilizador,
 - b) que está liofilizado, o
 - c) que comprende uno o más anticuerpos anti-IL-6 que comprende (a) una cadena V_H que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3, 18, o 19; y (b) una cadena V_L que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 2 o 20, o un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un fragmento derivado de los mismos.
9. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 3 para su uso en un agente terapéutico o diagnóstico.
10. El uso de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 – 3 en la fabricación de un medicamento o en la fabricación de un agente para su uso en un método de tratamiento.
11. Un anticuerpo o fragmento para su uso en un agente terapéutico de acuerdo con la reivindicación 9 o el uso de acuerdo con la reivindicación 10:
- a) donde la enfermedad o afección que se va a tratar se selecciona de entre fatiga general, fatiga inducida por el ejercicio, fatiga relacionada con el cáncer, fatiga relacionada con enfermedades inflamatorias, síndrome de fatiga crónica, caquexia relacionada con el cáncer, caquexia relacionada con enfermedades cardíacas, caquexia relacionada con enfermedades respiratorias, caquexia relacionada con enfermedades renales, caquexia relacionada con la edad, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico (LES), artritis idiopática sistémica juvenil, psoriasis, artropatía psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad intestinal inflamatoria (IBD), polimialgia reumática, arteritis de células gigantes, vasculitis autoinmunitaria, enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD), síndrome de Sjögren, enfermedad de Still de aparición en el adulto, osteoartritis, osteoporosis, enfermedad de Paget del hueso, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de próstata, leucemia, cáncer de células renales, enfermedad multicéntrica de Castleman, cáncer ovárico, resistencia a fármacos en quimioterapia del cáncer, toxicidad a la quimioterapia en el cáncer, enfermedad isquémica cardíaca, aterosclerosis, obesidad, diabetes, asma, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, enfermedad cerebrovascular, fiebre, respuesta de fase aguda, alergias, anemia, anemia de inflamación (anemia de enfermedad crónica), hipertensión, depresión, depresión asociada con enfermedad crónica, trombosis, trombocitosis, fallo cardíaco agudo, síndrome metabólico, aborto natural, prostatitis crónica, glomerulonefritis, enfermedad inflamatoria pélvica, lesión por re-perfusión, rechazo de implantes, gripe aviar, varicela, gripe pandémica, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), síndrome respiratorio agudo severo (SARS), sepsis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), artritis, un cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, o una afección inflamatoria.
 - b) donde el tratamiento incluye además la administración de otro agente terapéutico o régimen seleccionado de entre quimioterapia, radioterapia, administración de citocinas, o terapia génica, o
 - c) que se utiliza para tratar un efecto secundario del cáncer o infección vírica.
12. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para su uso en un agente diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 9, donde el uso es para la formación de imágenes diagnósticas in vivo
- a) donde dicho uso detecta la presencia de células que expresan IL-6 que comprende la administración de una cantidad diagnósticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti-IL-6 humana de acuerdo con la reivindicación 1,
 - b) donde dicha administración incluye además la administración de un radionúclido o fluoróforo que facilita la detección del anticuerpo en los sitios enfermos que expresan IL-6,
 - c) que se utiliza para detectar tumores o metástasis que expresan IL-6,

d) que se utiliza para detectar la presencia de sitios de inflamación asociados con células que expresan IL-6, o
e) donde los resultados se utilizan para facilitar el diseño de un régimen terapéutico apropiado.

13. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo para su uso como un agente diagnóstico de acuerdo con la
5 reivindicación 9, donde el uso es para la formación de imágenes diagnósticas in vivo donde el uso

a) es para detectar o formar la imagen de tumores o metástasis que expresan IL-6, o
b) es para detectar o formar la imagen de sitios inflamatorios que expresan IL-6.

FIG. 1

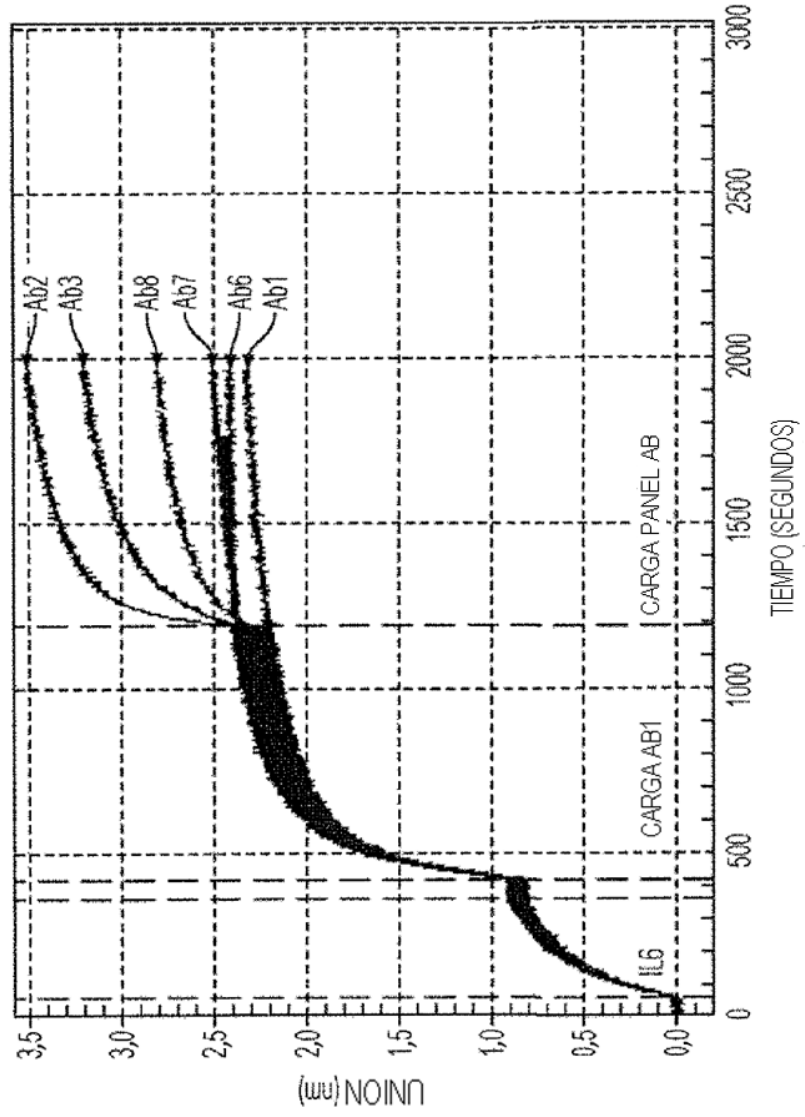


FIG. 2

```

FR1      CDR1      FR2      CDR2      FR3      88
1  AYDMTQTTPASVEVAVGGTVIINC QASETIYSWLS 34 35 49 50 56 57
RbcVL  AYDMTQTTPASVEVAVGGTVIINC QASETIYSWLS WYQQKPGQPPKLLIY QASDLAS GVPSRFRSGSGAGTEYTLTISGVCDDAATYYC
L12A  DIQMTQSPSTLSASVGRVTITC RASQSISSWLA WYQQKPKAPKLLIY KASSLES GVPSRFRSGSGGTEFTLTISSLQPDFFATYYC
V1    DIQMTQSPSTLSASVGRVTITC RASQSISSWLA WYQQKPKAPKLLIY DASSLES GVPSRFRSGSGGTEFTLTISSLQPDFFATYYC
Vx:02 DIQMTQSPSLSASVGRVTITC RASQSISSYIN WYQQKPKAPKLLIY AASSLQS GVPSRFRSGSGGTEFTLTISSLQPDFFATYYC
V1h   DIQMTQSPSTLSASVGRVTITC QASETIYSWLS WYQQKPKAPKLLIY QASDLAS GVPSRFRSGSGGTEFTLTISSLQPDFFATYYC

CDR3      FR4
89 100 101 111
RbcVL  QGGYSGSNVDNV FGGGTEVVVKKR
      |||||
      FGGGTKVEIKR

V1h   QGGYSGSNVDNV FGGGTKVEIKR

FR1      CDR1      FR2      CDR2      FR3      66 67 98
1  QEQLKESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLN DHAMG WVRQAPGKGLLEYIG FINS-GGSARYASWAEG RFTISRST--TVDLKMTSLTTEDTATYFCVR
RbcVH  QEQLKESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLN DHAMG WVRQAPGKGLLEYIG FINS-GGSARYASWAEG RFTISRST--TVDLKMTSLTTEDTATYFCVR
3-64-04 QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFS SYAMH WVRQAPGKGLLEYVS AISSNGGSTYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-66-04 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTVS SNYMS WVRQAPGKGLLEWVS VIYS-GGSTYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
3-53-02 EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVS SNYMS WVRQAPGKGLLEWVS VIYS-GGSTYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

V1h   QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSLN DHAMG WVRQAPGKGLLEYVG FINS-GGSARYASSAEG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

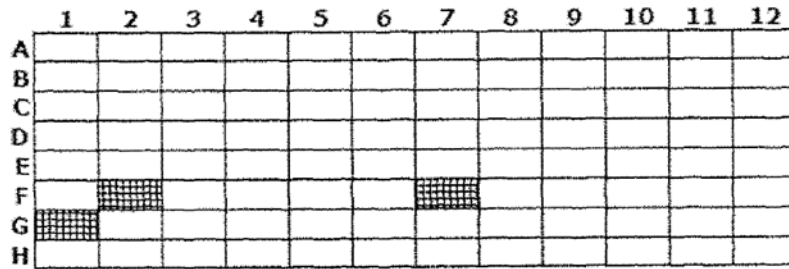
CDR3      FR4
99 110 111 121
RbcVH  GGAVMSIHSFDP WGGGTLVTVSS
      |||||
      WGGGTLVTVSS


V1h   GGAVMSIHSFDP WGGGTLVTVSS

```

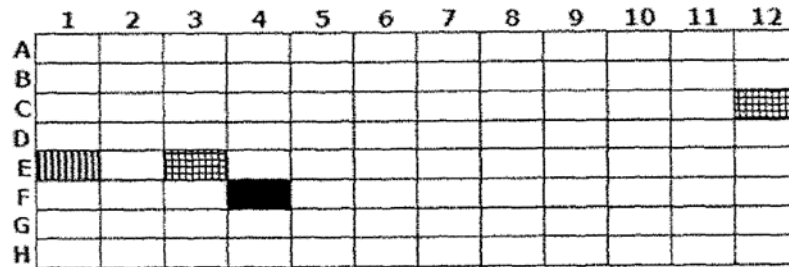
FIG. 3

460

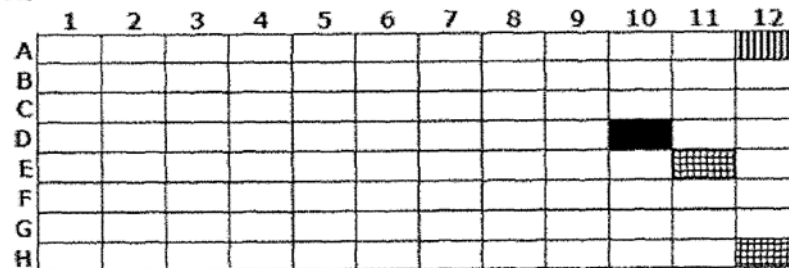



 Solo IgG
 IL-6 o B-IL-6
 IgG + IL-6
 o B-IL-6

461



462



463

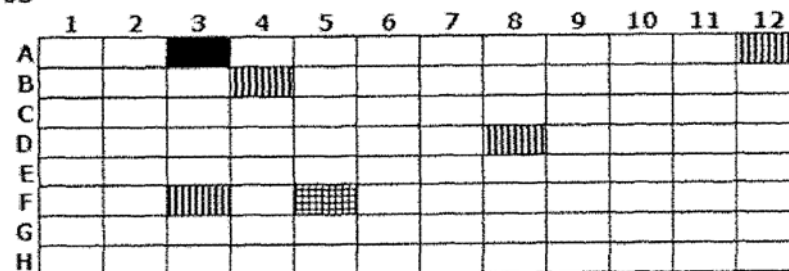


FIG. 4

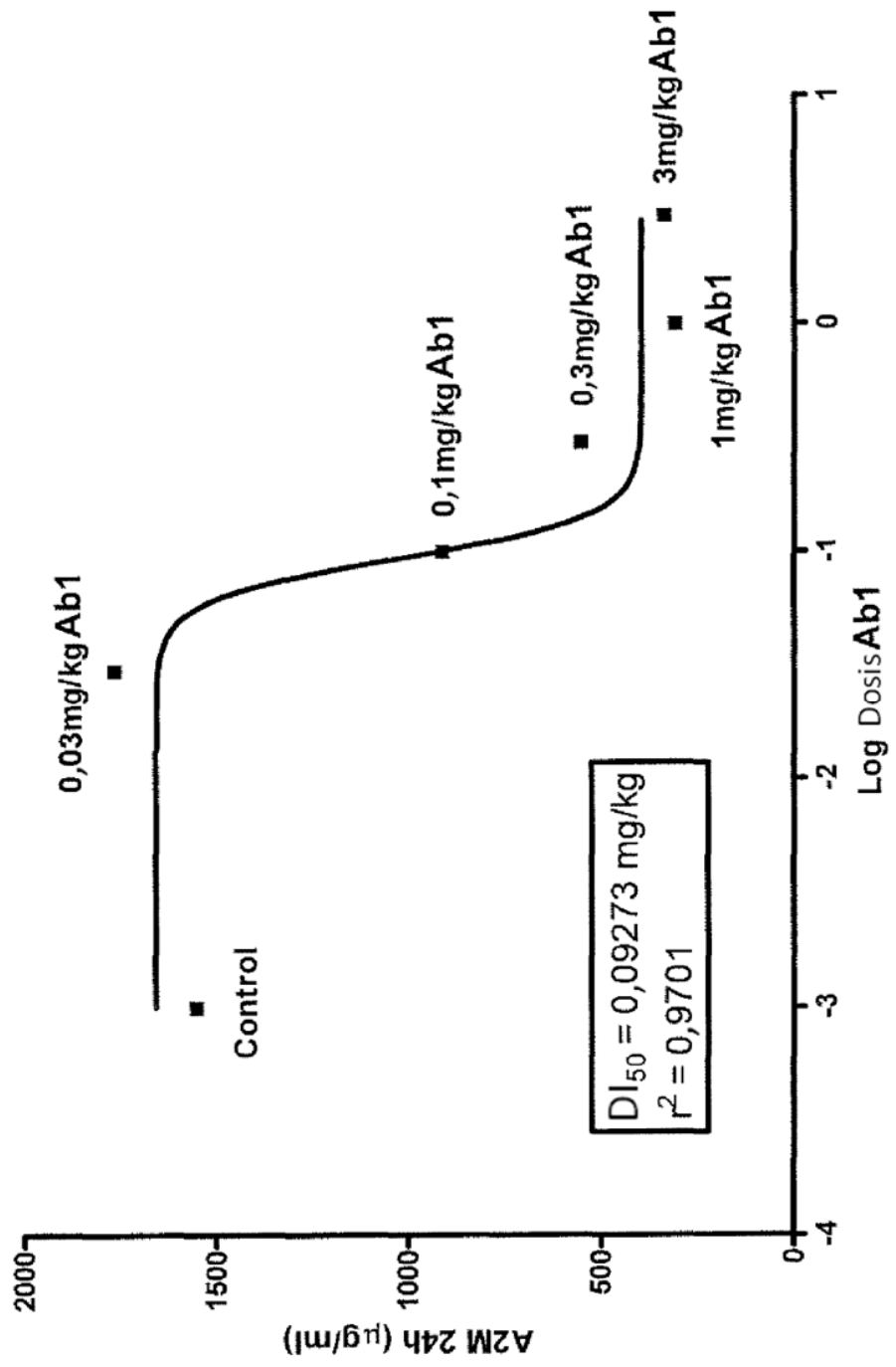


FIG. 5

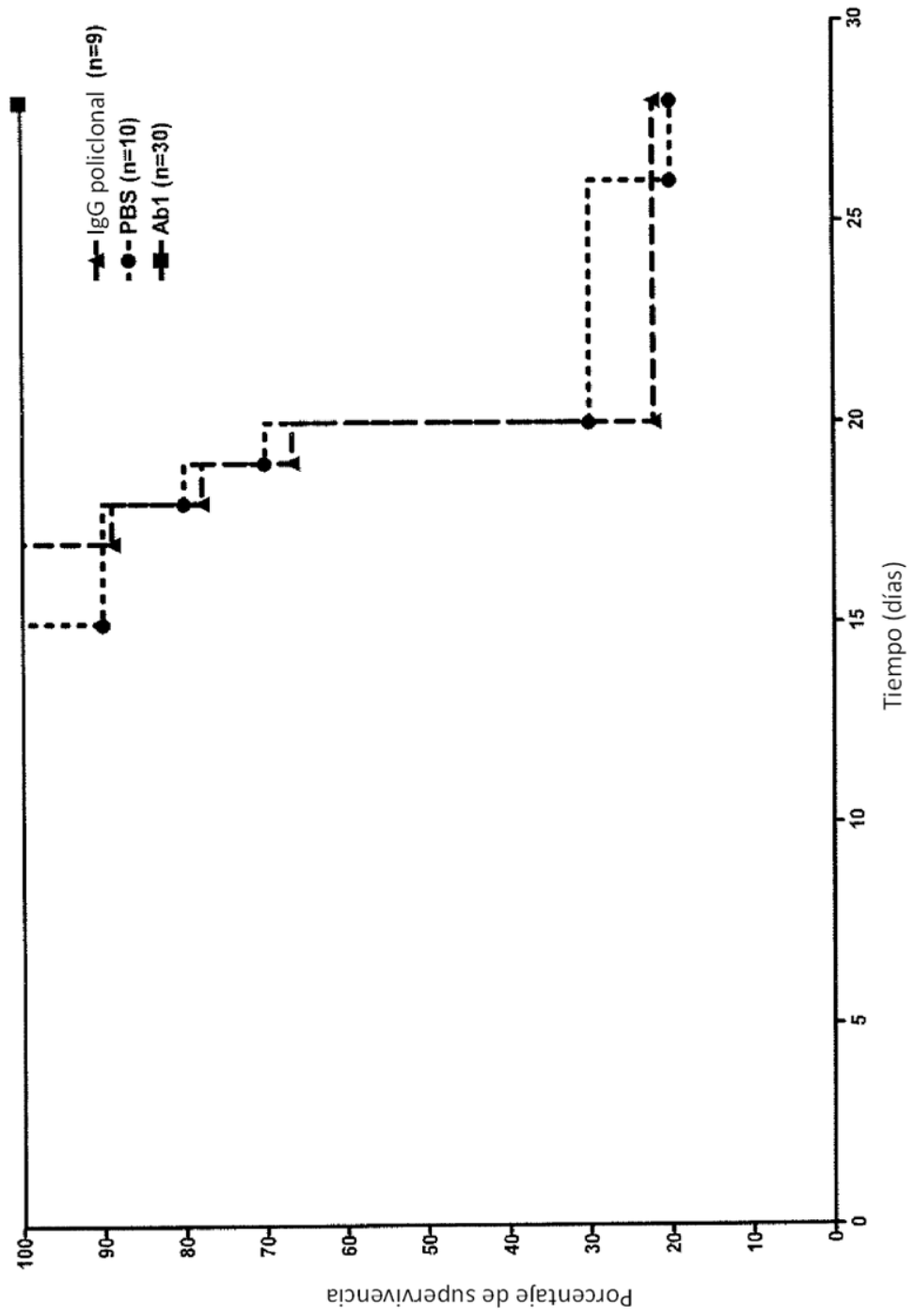


FIG. 6

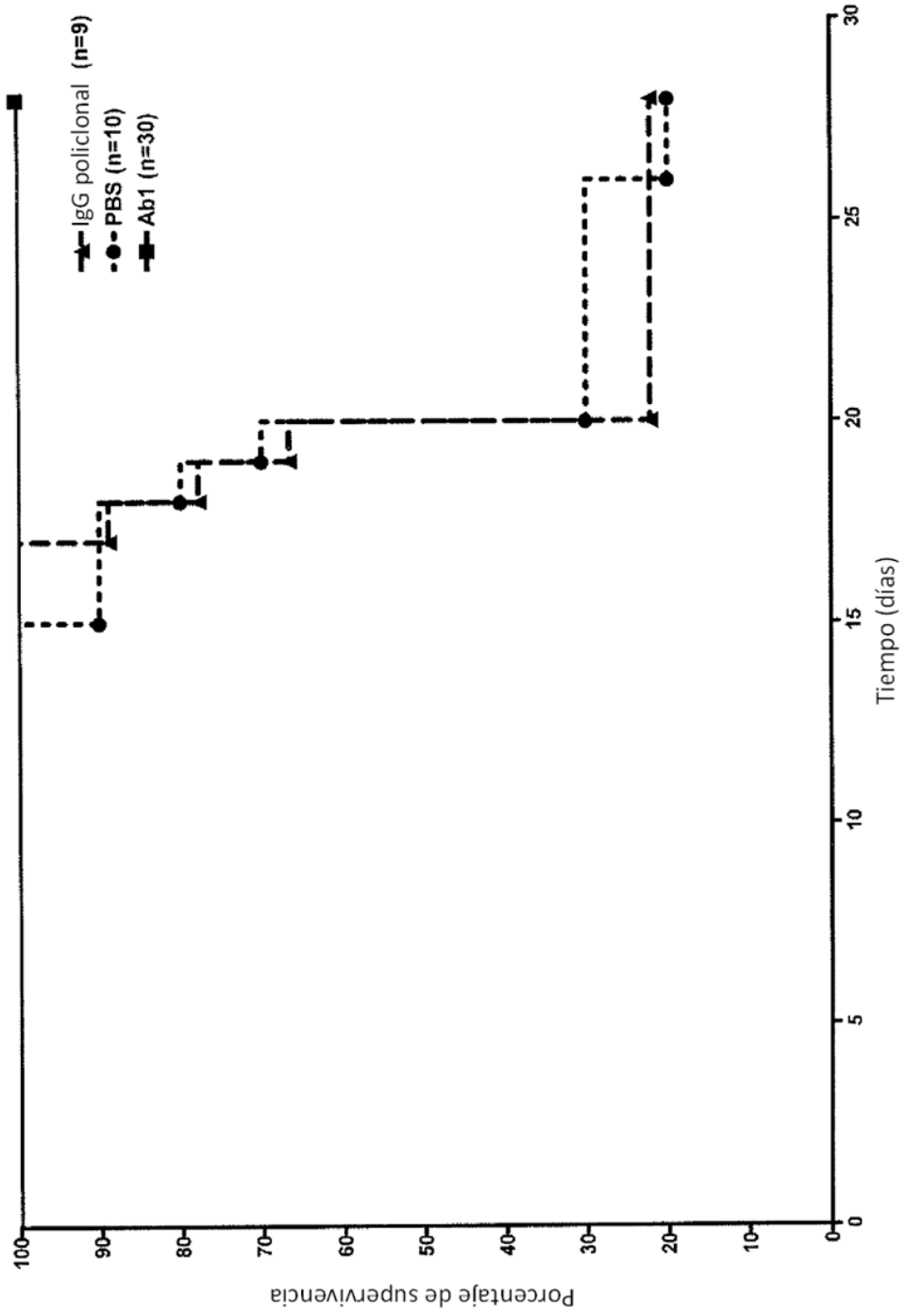


FIG. 7

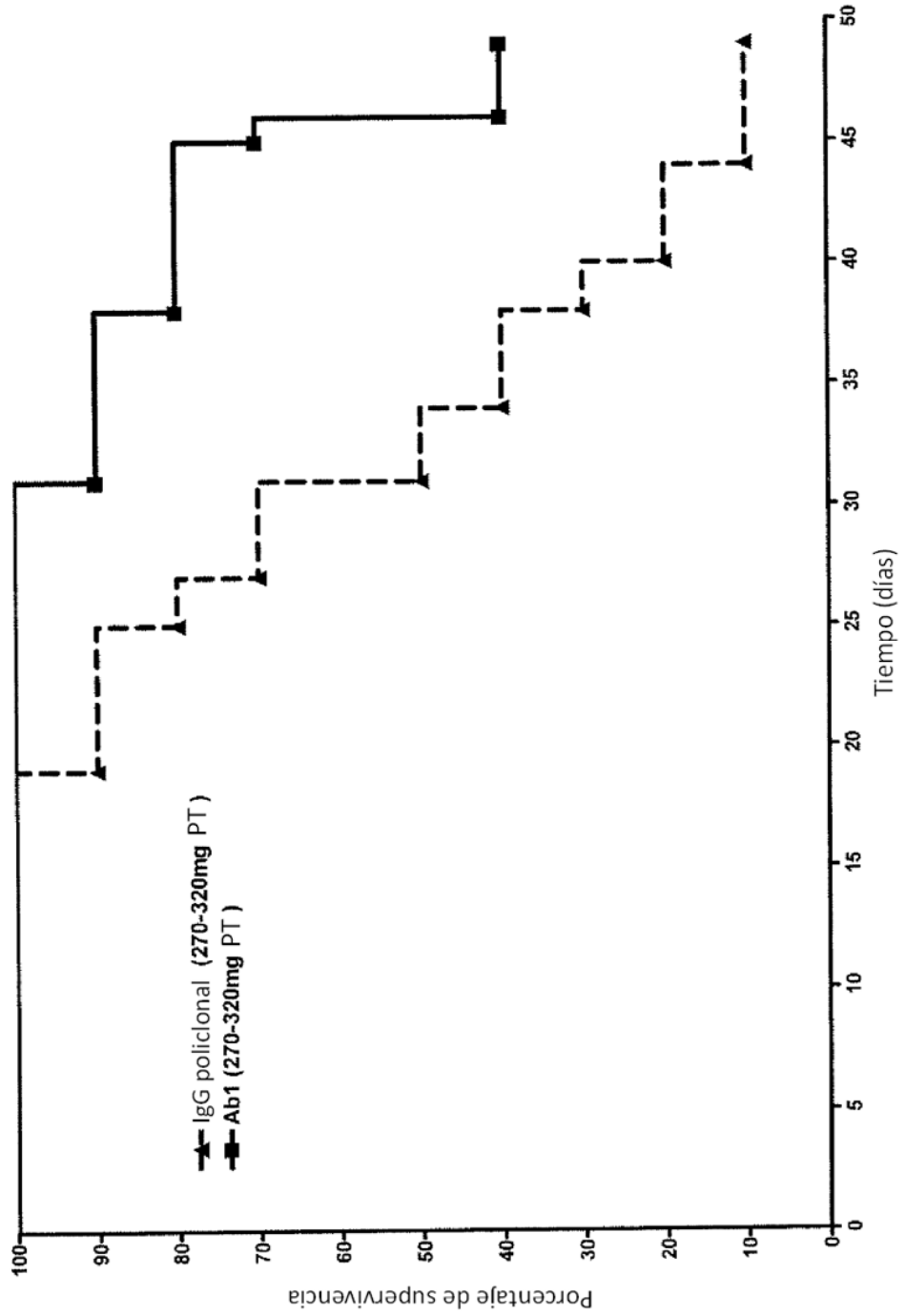


FIG. 8

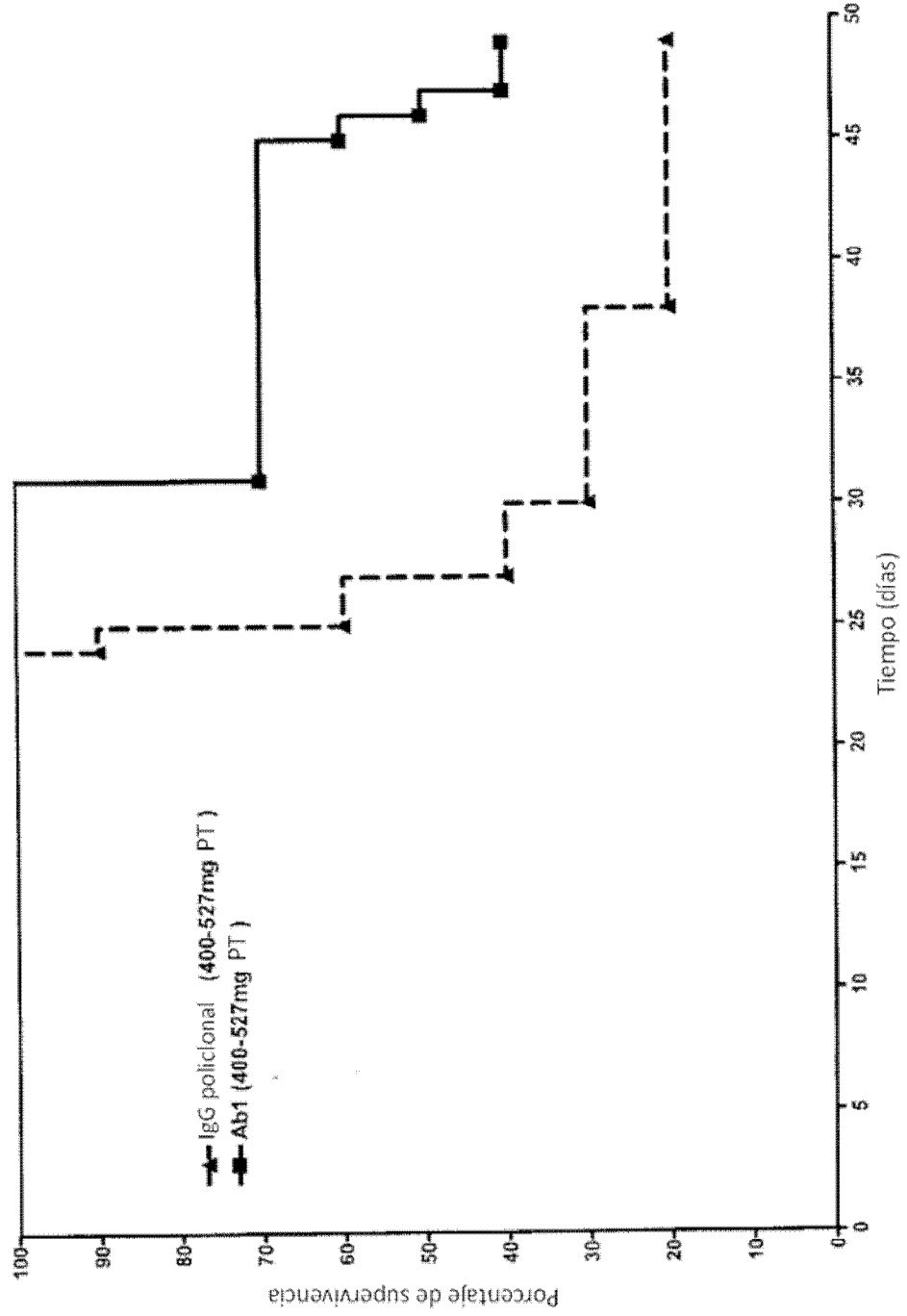


FIG. 9

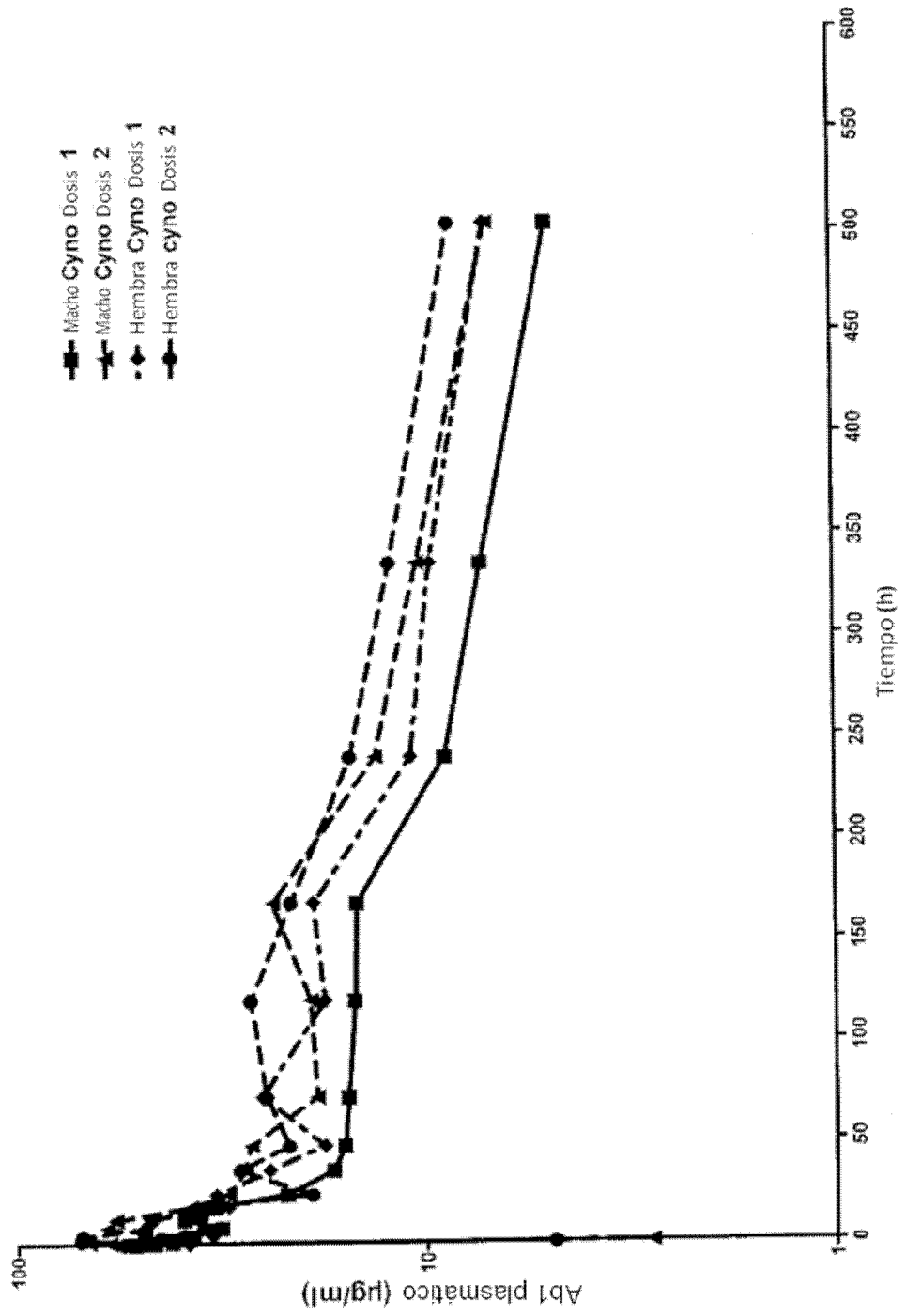


FIG. 10A

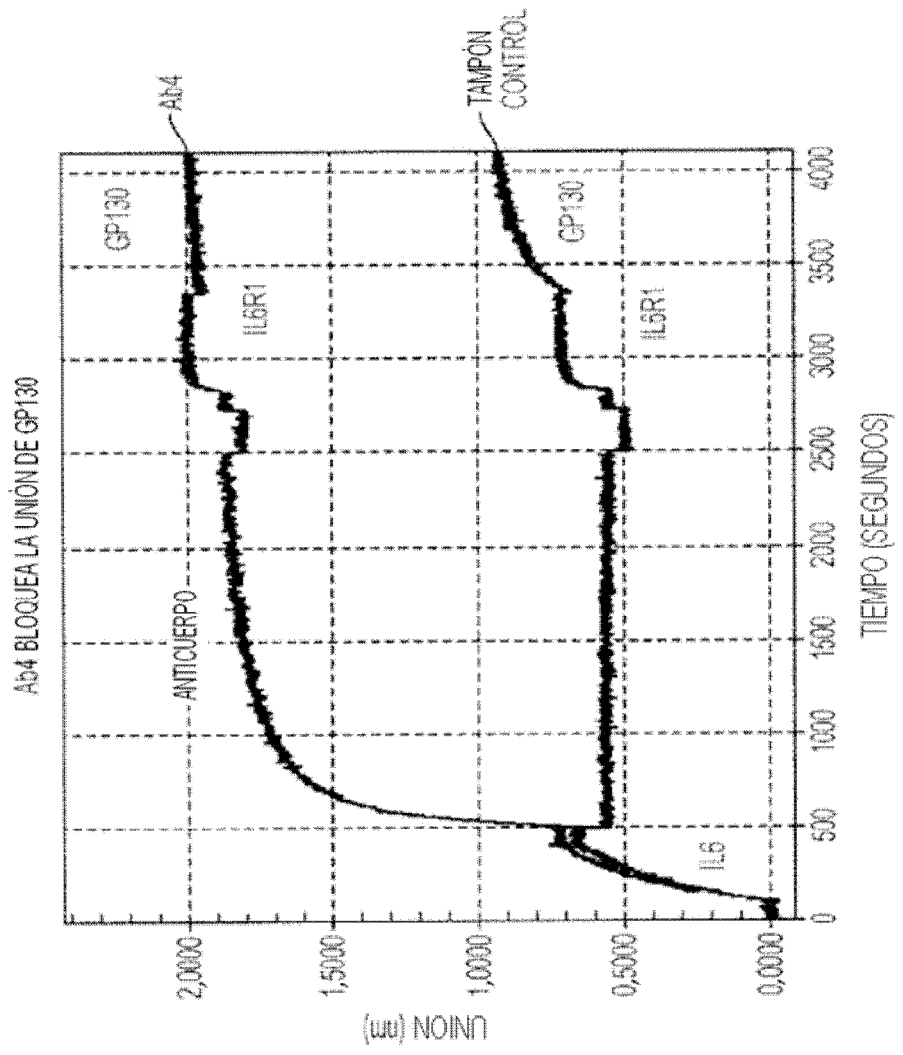


FIG. 10B

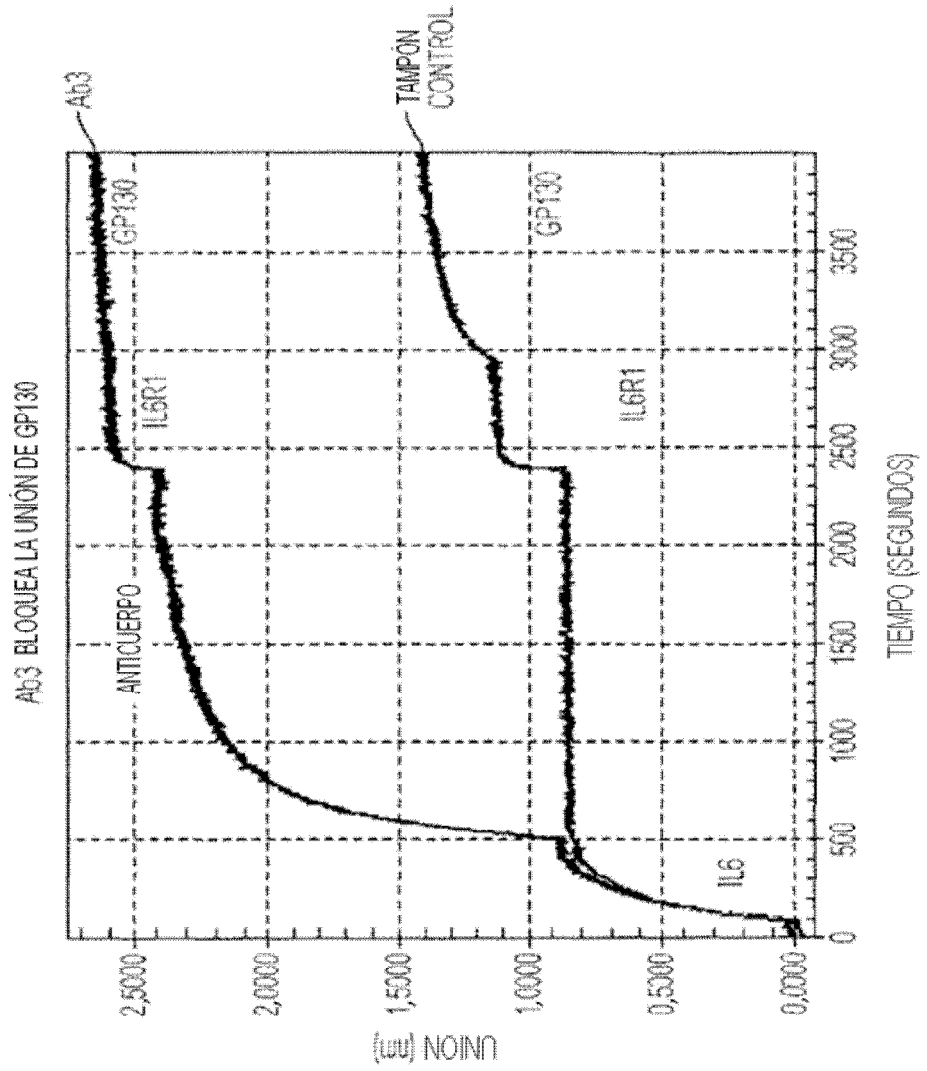


FIG. 10C

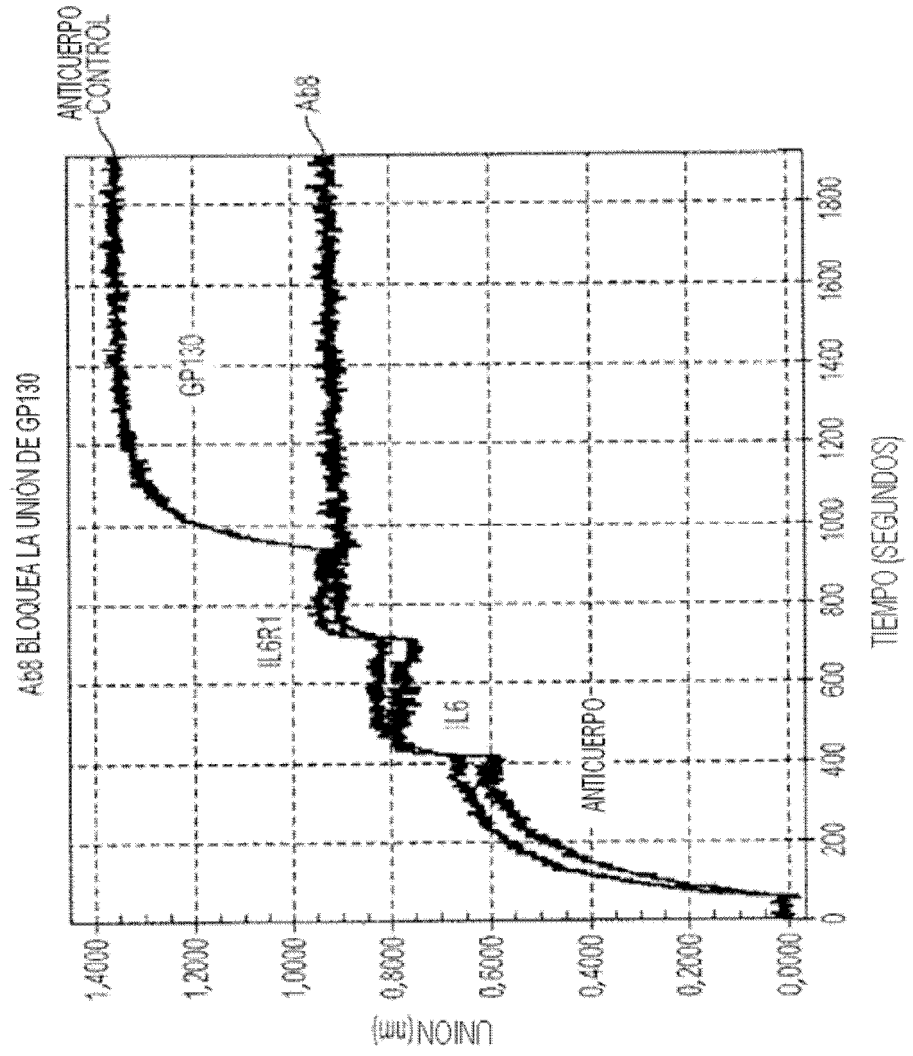


FIG. 10D

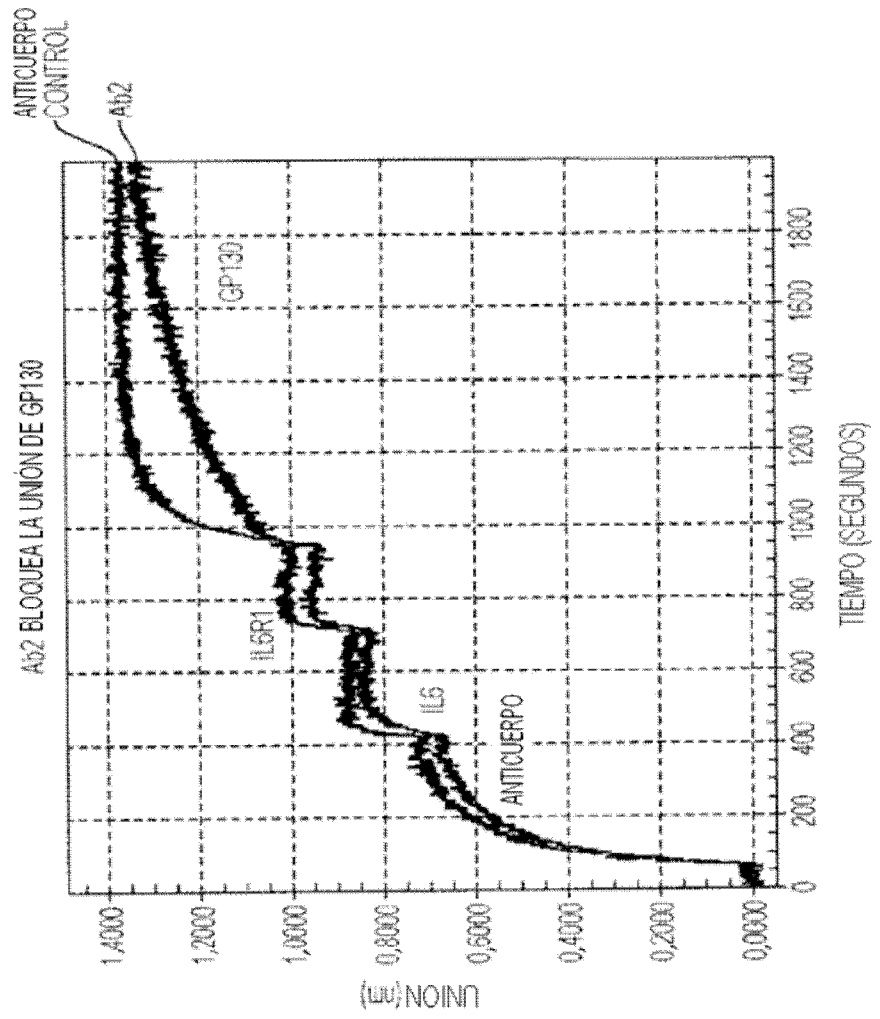


FIG. 10E

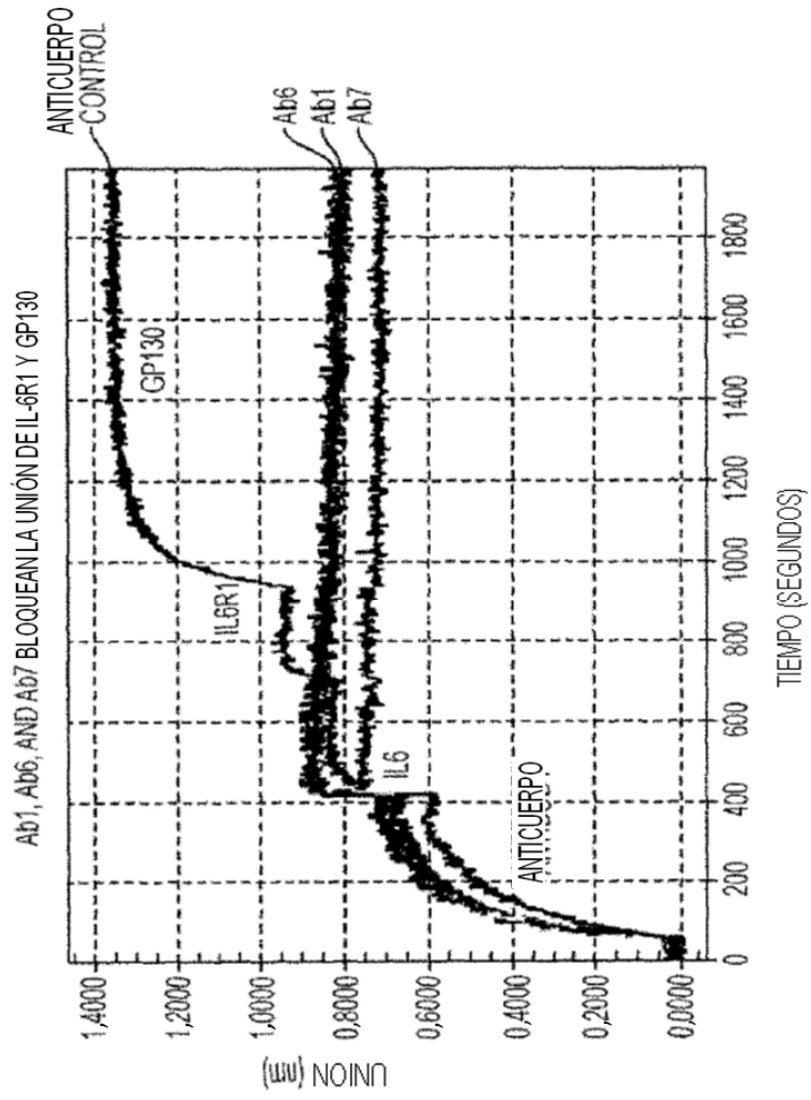


FIG. 11

Anticuerpo	Bloquea la unión de IL-6 a R1	Bloquea la unión de IL-6 a GP130	Referencia
Ab1	SÍ	SÍ	021051
Ab2	No	Parcial	021050
Ab3	No	SÍ	021030
Ab4	No	SÍ	021050
Ab6	SÍ	SÍ	021051
Ab7	SÍ	SÍ	021051
Ab8	No	SÍ	021051

FIG. 12

1	VPPGEDSKDVAAPHR (SEQ ID NO: 590)	20	ENNLNLPKMAEKGC (SEQ ID NO: 609)	39	QMSPKVLIQFLQKKA (SEQ ID NO: 628)
2	GEDSKDVAAPHRQPL (SEQ ID NO: 591)	21	LNLPKMAEKDGCQFS (SEQ ID NO: 610)	40	TKVLIQFLQKAKNL (SEQ ID NO: 629)
3	SKDVAAPHRQPLTSS (SEQ ID NO: 592)	22	PKMAEKDGCQFSGFN (SEQ ID NO: 611)	41	LIQFLQKAKNLDAI (SEQ ID NO: 630)
4	VAAPHRQPLTSSERI (SEQ ID NO: 593)	23	AEKDCQFSQGFNEET (SEQ ID NO: 612)	42	FLOKAKNLDAITTP (SEQ ID NO: 631)
5	PHRQPLTSSERIDKQ (SEQ ID NO: 594)	24	DGCFQSGFNEETCLV (SEQ ID NO: 613)	43	KKAKNLDAITTPDPT (SEQ ID NO: 632)
6	QPLTSSERIDKQIRY (SEQ ID NO: 595)	25	FQSGFNEETCLVKII (SEQ ID NO: 614)	44	KNLDAITTPDPTTNA (SEQ ID NO: 633)
7	TSSERIDKQIRYILD (SEQ ID NO: 596)	26	GFNEETCLVKIITGL (SEQ ID NO: 615)	45	DAITTPDPTTNASLL (SEQ ID NO: 634)
8	ERIDKQIRYILDGIS (SEQ ID NO: 597)	27	EETCLVKIITGLLEF (SEQ ID NO: 616)	46	TPDPTTNASLLTKL (SEQ ID NO: 635)
9	DKQIRYILDGISALR (SEQ ID NO: 598)	28	CLVKIITGLLEFEVY (SEQ ID NO: 617)	47	DPTTNASLLTKLQAAQ (SEQ ID NO: 636)
10	IRYILDGISALRKET (SEQ ID NO: 599)	29	KIITGLLEFEVYLEY (SEQ ID NO: 618)	48	TNASLLTKLQAAQNW (SEQ ID NO: 637)
11	ILDGISALRKETCNK (SEQ ID NO: 600)	30	TGLLEFEVYLEYLQN (SEQ ID NO: 619)	49	SLLLTKLQAAQNWLOD (SEQ ID NO: 638)
12	GISALRKETCNKSNM (SEQ ID NO: 601)	31	LEFEVYLEYLQNRFE (SEQ ID NO: 620)	50	TKLQAAQNWLODMTT (SEQ ID NO: 639)
13	ALRKETCNKSNMCE (SEQ ID NO: 602)	32	EVYLEYLQNRFESE (SEQ ID NO: 621)	51	QAQNWLODMTTHLI (SEQ ID NO: 640)
14	KETCNKSNMCESSKE (SEQ ID NO: 603)	33	LEYLQNRFESEBEQA (SEQ ID NO: 622)	52	NQWLODMTTHLILRS (SEQ ID NO: 641)
15	CNKSNMCESSKEALA (SEQ ID NO: 604)	34	LQNRFESEBEQARAV (SEQ ID NO: 623)	53	LQDMTTHLILRSFKE (SEQ ID NO: 642)
16	SNMCESSKEALAE (SEQ ID NO: 605)	35	RFESSEBEQARAVQMS (SEQ ID NO: 624)	54	MTTHLILRSFKEFLQ (SEQ ID NO: 643)
17	CESSKEALAE (SEQ ID NO: 606)	36	SSEBEQARAVQMSPKV (SEQ ID NO: 625)	55	HLILRSFKEFLQSSL (SEQ ID NO: 644)
18	SKEALAE (SEQ ID NO: 607)	37	EQARAVQMSPKVLIQ (SEQ ID NO: 626)	56	LRSEFKEFLQSSLRAL (SEQ ID NO: 645)
19	ALAE (SEQ ID NO: 608)	38	RAVQMSPKVLIQFLQ (SEQ ID NO: 627)	57	FKEFLQSSLRALRQM (SEQ ID NO: 646)

FIG. 13

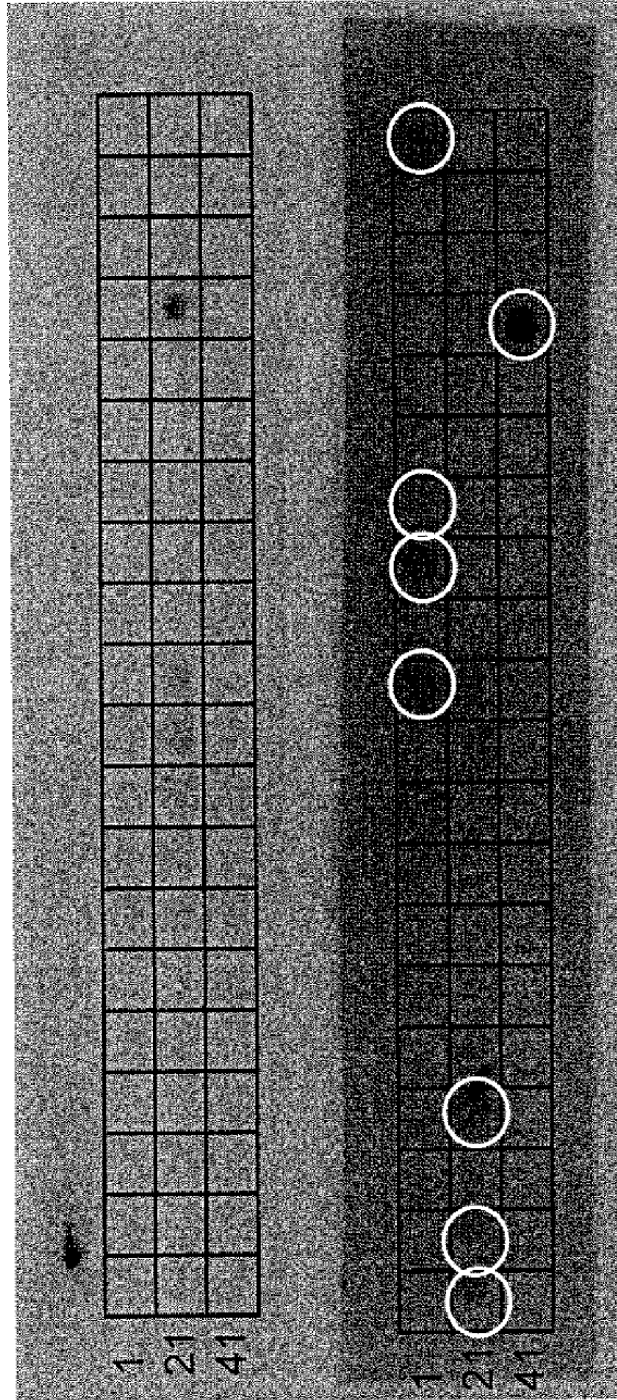


FIG. 14

