

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 949**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2011 PCT/EP2011/070604**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2012 WO12069433**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2011 E 11785424 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2643352**

54 Título: **Proteínas de unión a antígenos para la oncostatina M (OSM)**

30 Prioridad:

23.11.2010 US 416495 P

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

17.09.2018

73 Titular/es:

**GLAXO GROUP LIMITED (100.0%)
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**BEMBRIDGE, GARY PETER;
CHUNG, CHUN-WA;
FEENEY, MARIA;
FORD, SUSANNAH KAREN;
KIRBY, IAN y
MCADAM, RUTH**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 681 949 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

Proteínas de unión a antígenos para la oncostatina M (OSM)

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a inmunoglobulinas que se unen específicamente a oncostatina M (OSM) y, en particular, a la OSM humana (hOSM).

La presente invención también se refiere a métodos para tratar enfermedades o trastornos con dichas inmunoglobulinas, a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas inmunoglobulinas y a métodos de fabricación. Otras realizaciones de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción.

Antecedentes de la invención

10 La oncostatina M es una glicoproteína de 28 KDa que pertenece a la familia de citoquinas de la interleuquina 6 (IL-6) que incluye la IL-6, el factor inhibidor de leucemia (LIF), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), la cardiotropina-1 (CT-1) y la citoquina similar a cardiotropina-1 (véase Kishimoto T. *et al.* (1995), *Blood*, 86:1243-1254), que comparten el receptor de señalización transmembrana gp130 (véase Taga T. y Kishimoto T. (1997), *Annu. Rev. Immunol.*, 15:797-819). La OSM fue descubierta originariamente por su capacidad para inhibir el crecimiento de la línea de células de melanoma A375 (véase Malik N. (1989) *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 9:2847-2853). Después se descubrieron más efectos y se determinó que era un mediador multifuncional, como otros miembros de la familia de IL-6. La OSM es producida en una diversidad de tipos de células, que incluyen macrófagos, células T activadas (véase Zarling J.M. (1986), *PNAS (USA)*, 83:9739-9743), neutrófilos polimorfonucleares (véase Grenier A. *et al.* (1999), *Blood*, 93:1413-1421), eosinófilos (véase Tamura S. *et al.* (2002), *Dev. Dyn.*, 225:327-331), células dendríticas (véase Suda T. *et al.* (2002), *Cytokine*, 17:335-340). También se expresa en páncreas, riñón, testículos, bazo, estómago y cerebro (véase Znoyko I. *et al.* (2005), *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell Evol. Biol.*, 283:182-186), y médula ósea (véase Psenak O. *et al.* (2003), *Acta Haematol.*, 109:68-75). Sus principales efectos biológicos incluyen la activación del endotelio (véase Brown T.J. *et al.* (1993), *Blood*, 82:33-37), la activación de la respuesta de fase aguda (véase Benigni F. *et al.* (1996), *Blood*, 87:1851-1854), la inducción de la diferenciación o la proliferación celular, la modulación de la liberación de mediadores inflamatorios y la hematopoyesis (véase Tanaka M. *et al.* (2003), 102:3154-3162), la remodelación del hueso (véase de Hooge A.S.K. (2002), *Am. J. Pathol.*, 160:1733-1743) y la estimulación de la angiogénesis (véase Vasse M. *et al.* (1999), *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19:1835-1842) y la curación de heridas.

30 Los receptores para la OSM (receptor β de OSM, "OSMR β ") son expresados sobre una amplia gama de células, que incluyen células epiteliales, condrocitos, fibroblastos (véase Langdon C. *et al.* (2003), *J. Immunol.*, 170:548-555), músculo liso neuronal, nódulos linfáticos, hueso, corazón, intestino delgado, pulmón y riñón (véase Tamura S. *et al.* (2002), *Mech. Dev.* 115:127-131) y células endoteliales. Varias líneas de evidencias sugieren que las células endoteliales son la diana principal de la OSM. Estas células expresan de 10 a 20 veces más receptores de alta y baja afinidad y muestran alteraciones profundas y prolongadas en el fenotipo tras la estimulación con OSM (véase Modur V. *et al.* (1997), *J. Clin. Invest.*, 100:158-168). Además, la OSM es un importante factor de crecimiento autocrino para las células del sarcoma de Kaposi, que se cree que son de origen endotelial (véase Murakami-Mori K. *et al.* (1995), *J. Clin. Invest.*, 96:1319-1327).

40 Al igual que otras citoquinas de la familia de IL-6, la OSM se une a la glicoproteína transdutora de señales transmembrana gp130. Una característica clave de las citoquinas de gp130 es la formación de complejos de receptor oligoméricos que comprenden gp130 y uno o más correceptores dependiendo del ligando (publicado en Heinrich P.C. *et al.* (2003), *Biochem. J.*, 374:1-20). Como resultado, estas citoquinas pueden mediar en actividades biológicas exclusivas y compartidas *in vitro* e *in vivo* dependiendo de la composición del complejo de receptor formado. La OSM humana (hOSM) se diferencia de otras citoquinas IL-6 porque puede formar complejos con gp130 y con uno de los dos correceptores LIFR o el receptor de oncostatina (OSMR). La figura 27 ilustra la interacción entre hOSM y gp130, LIFR y OSMR. Se ha resuelto la estructura cristalina de hOSM y se ha demostrado que comprende un haz de cuatro α -hélices con dos sitios de glicosilación potenciales. Se han identificado dos sitios de unión al ligando distintos mediante mutagénesis específica dirigida a sitio en la molécula de hOSM (véase Deller M.C. *et al.* (2000), *Structural Fold Des.*, 8:863-874). El primero, denominado sitio II (a veces "sitio 2") interacciona con gp130, y el segundo sitio, denominado sitio III (a veces "sitio 3"), en el extremo opuesto de la molécula, interacciona con LIFR o con OSMR. Experimentos de mutagénesis han demostrado que los sitios de unión para LIFR y OSMR son casi idénticos, pero se diferencian en una única mutación de aminoácido.

55 Cada vez hay para pruebas que apoyan la hipótesis de que la modulación de la interacción de OSM-gp130 puede ser beneficiosa en el tratamiento de la AR y otras enfermedades y trastornos, en particular enfermedades y trastornos inflamatorios crónicos, tales como la osteoartritis, la fibrosis pulmonar idiopática, el dolor, la enfermedad inflamatoria del pulmón, la enfermedad cardiovascular y la psoriasis.

La OSM se encuentra en el FS de pacientes con AR humanos (véase Hui W. *et al.* (1997), 56:184-187). Estos niveles se correlacionan con el número de neutrófilos en el FS, los niveles de TNF alfa (a veces "TNF") en el FS, y con marcadores de la destrucción del cartilago (Manicourt D.H. *et al.* (2000), *Arthritis Rheum.*, 43:281-288). Además,

el tejido sinovial de pacientes con AR segrega OSM de modo espontáneo *ex vivo* (véase Okamoto H. *et al.* (1997), *Arthritis and Rheumatism*, 40:1096-1105). También se ha demostrado que la OSM está presente en macrófagos sinoviales (Cawston T.E. *et al.* (1998), *Arthritis Rheum.*, 41:1760-1771) y, tal como mencionó anteriormente, los receptores de OSM y gp130 se expresan sobre células endoteliales, fibroblastos sinoviales, condrocitos y osteoblastos. La expresión adenovírica de la OSM murina (mOSM) en las articulaciones de ratones normales produce artritis erosiva e inflamatoria grave (véase Langdon C. *et al.* (2000), *Am. J. Pathol.*, 157:1187-1196). Se observa una enfermedad agresiva similar en ratones atímicos que carecen de TNF, IL-1, IL-6 e iNOS tras la administración de mOSM adenovírica (véase de Hooge A.S.K. *et al.* (2003), *Arthritis and Rheumatism*, 48:1750-1761), lo cual demuestra que la OSM puede mediar en todas las manifestaciones de la patología de la artritis. La expresión de OSM de ratón empleando un vector de mOSM expresado adenovíricamente provoca daños en la placa de crecimiento que son típicos de la artritis idiopática juvenil (véase de Hooge A.S.K. *et al.* (2003), *Arthritis and Rheumatism*, 48:1750-1761). En un modelo experimental de artritis inducida por colágeno, un anticuerpo anti-OSM administrado terapéuticamente a ratones evita el avance posterior de la enfermedad. Se observan resultados similares cuando el anti-OSM se administra de modo profiláctico a ratones con artritis inducida por pristano, un modelo de recaída/remisión parecido a la enfermedad humana (véase Plater-Zyberk C. *et al.* (2001), *Arthritis and Rheumatism*, 44).

La osteoartritis es un trastorno que afecta a las articulaciones. La osteoartritis tiene tres características. Provoca daños en el cartílago, la superficie fuerte y lisa que reviste los huesos y permite a las articulaciones moverse con facilidad y sin fricción. Produce recrecimientos óseos que se desarrollan alrededor del borde de las articulaciones, y provoca inflamación leve de los tejidos alrededor de las articulaciones (sinovitis). Se ha demostrado que la OSM desempeña un papel importante en la degradación del cartílago, la inflamación y el recambio óseo y, por tanto, el bloqueo de esta citoquina podría desempeñar un papel en aspectos clave de la patogénesis de enfermedades. La OSM actúa de modo sinérgico con la IL-1 o el TNF para inducir la colagenólisis en el cartílago nasal humano, que implica la pérdida de proteoglicanos (PG) y colágeno, correlacionándose esto último con la inducción de MMP-1 y MMP-13. La OSM con IL-1 también induce la pérdida de PG del cartílago articular humano, pero el aumento en la pérdida de colágeno no es significativo (Morgan *et al.*, 2006). Una serie de estudios que emplean vectores adenovíricos para aumentar las concentraciones de citoquinas en articulaciones han demostrado que la sobreexpresión de OSM induce la inflamación, la formación de pannus, la destrucción de cartílago y la erosión del hueso (Langdon *et al.*, 2000). Globalmente, la bibliografía sugiere que la OSM, en particular cuando se combina con otras citoquinas, induce a las proteasas que están implicadas en la degradación de proteoglicanos y colágeno, dando como resultado la degradación del cartílago y la erosión del hueso.

La información procedente de la bibliografía sugiere que la molécula de OSM puede tener cierta implicación en el proceso inflamatorio asociado con la psoriasis. Los trabajos de Boifati *et al.* (1998) demuestran que la liberación espontánea de OSM aumenta en cultivos de órganos en lesiones psoriáticas, comparado con una piel psoriática sin lesiones y con piel normal (Kunsefeld *et al.*, 2004). Los queratinocitos expresan el receptor de esta molécula y la respuesta al ligando provoca la migración de los queratinocitos y aumenta el espesor de la epidermis reconstituida. Unos análisis de micromatrices que comparan los efectos moduladores de genes de OSM con 33 citoquinas diferentes indican que es un potente activador de queratinocitos y que puede actuar en sinergia con citoquinas proinflamatorias en la inducción de moléculas, tales como la expresión de S100A7 y β -defensina 2, características de la piel psoriática (Gazel *et al.*, 2006).

En la bibliografía también se sugiere un papel para la OSM en enfermedades pulmonares inflamatorias, tales como asma y fibrosis pulmonar. Estas enfermedades se caracterizan por un aumento del depósito de matriz extracelular (MEC), concomitante con la proliferación y la activación de fibroblastos subepiteliales. Se ha detectado OSM en el fluido de lavado bronquioalveolar de pacientes durante lesiones agudas de pulmón, en particular en casos de neumonía (Grenier *et al.*, 2001).

Se ha detectado OSM en el cerebro de pacientes con MS, en donde se localiza en la microglia, los astrocitos y en leucocitos infiltrantes (Ruprecht *et al.*, 2001). Además, las PBMC aisladas de pacientes con MS liberan espontáneamente más citoquinas, incluida OSM, que las células procedentes de controles sanos y pacientes con MS que muestran una tendencia a una mayor [OSM] en suero (Ensoli *et al.*, 2002).

Además de estimular la inflamación en el cerebro, la OSM puede contribuir directamente a la neurodegeneración, una característica de la enfermedad de Alzheimer, MS y un subconjunto de pacientes con VIH. Los sobrenadantes de monocitos procedentes de pacientes con VIH provocan una profunda inhibición del crecimiento de neuroblastos y la muerte de células neuronales. Estos efectos son mediados por la oncostatina M en el sobrenadante del cultivo (Ensoli *et al.*, 1999). Puesto que muchos pacientes con VIH padecen atrofia cerebral provocada por la pérdida de células neuronales, la OSM puede ser un mediador de esta patología.

Los trabajos de Tamura *et al.* sugieren que la OSM puede estar implicada en el desarrollo y el mantenimiento del dolor neuropático (2003). Sus estudios revelan un subconjunto de neuronas sensoriales nociceptivas que expresan el receptor OSM β . Todas las neuronas OSM β R +ve también expresan receptores VR1 y P2X3, que han demostrado ser fundamentales para el desarrollo del dolor neuropático e inflamatorio (Jarvis *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 2003). Se ha demostrado que los ratones OSM -/- muestran respuestas nocivas reducidas al dolor químico, térmico, visceral y mecánico (Morikawa *et al.*, 2004). De modo interesante, estos animales presentan un déficit en las neuronas de

pequeño tamaño VR1+, P2X3+, pero, por lo demás, los animales parecen normales.

En la bibliografía también se ha sugerido un papel para la OSM en la modulación de la biología de las células del cáncer. Se ha indicado que la OSM tiene propiedades estimulantes del crecimiento e inhibitoras del crecimiento en estudios que emplean líneas de células tumorales (Grant y Begly, 1999). Es un potente mitógeno para células derivadas del sarcoma de Kaposi (Miles *et al.*, 1992) y para líneas de células de mieloma (Zhang *et al.*, 1994). La OSM disminuye las tasas de crecimiento y aumenta la diferenciación de una serie de líneas de células tumorales, que incluyen de mama (Douglas *et al.*, 1998) y de pulmón (McKormick *et al.*, 2000). Sin embargo, aunque la OSM puede inhibir el crecimiento, al menos en algunas líneas de células de carcinoma de mama, también aumenta el desprendimiento de células y potencia el potencial metastásico (Holzer *et al.*, 2004; Jorczyk *et al.*, 2006). La OSM también sobreexpone la expresión y el estado de activación del receptor de hialuronano CD44 en algunas líneas de células tumorales (Cichy *et al.*, 2000), lo cual está asociado con el crecimiento y la metástasis de tumores (Yu *et al.*, 1997). Además, las propiedades angiogénicas de la OSM y su capacidad para inducir otros factores angiogénicos en algunas células tumorales (Repovic *et al.*, 2003) sugiere que puede contribuir a la angiogénesis tumoral en los tumores que expresan OSM. La bibliografía científica sugiere la implicación de OSM en la biología de tumores, pero indica su complejidad. Es posible que la neutralización de la OSM sea beneficiosa para el tratamiento de algunos tumores. Por otra parte, al igual que la neutralización del TNF e IL-6, en otros tumores presenta algunos riesgos potenciales.

Las pruebas procedentes de la bibliografía sugieren un papel potencial de OSM en la enfermedad cardiovascular. Se ha encontrado OSM en macrófagos tisulares en lesiones ateroscleróticas (Modur *et al.*, 1997) y, como factor angiogénico (Vasse *et al.*, 1999), puede estimular la neovascularización característica de las placas ateroscleróticas que se cree que contribuye a la fragilidad de la pared celular. Sin embargo, la OSM también induce la expresión de otros factores angiogénicos en células endoteliales, VEGF (Wijelah *et al.*, 1997) y bFGF (Bernard *et al.*, 1999). De modo interesante, las células endoteliales humanas presentan una densidad del receptor de OSM 10-20 mayor que otras células (Brown *et al.*, 1991).

Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una estrategia terapéutica para el tratamiento de la AR y otras enfermedades y trastornos, en particular enfermedades y trastornos inflamatorios crónicos, tales como la osteoartritis, la fibrosis pulmonar idiopática, el cáncer, el asma, el dolor, la enfermedad cardiovascular y la psoriasis. En particular, un objeto de la presente invención es proporcionar inmunoglobulinas, en especial anticuerpos que se unen específicamente a OSM (por ejemplo, hOSM, en particular su sitio II) y que modulan (es decir, inhiben o bloquean) la interacción entre OSM y gp130 en el tratamiento de enfermedades y trastornos que responden a la modulación de esta interacción.

En el documento WO99/48523, los inventores describieron el uso de antagonistas de OSM en el tratamiento de enfermedades y trastornos inflamatorios. Esta descripción emplea un anticuerpo anti-OSM de ratón en un modelo murino de artritis. Además, la solicitud de patente WO2005/095457 A2 describe un anticuerpo terapéutico que se une específicamente a OSM, en particular a hOSM, y modula la interacción entre OSM y gp130.

Breve descripción de la figuras

Figura 1: ELISA de gp130 humano - Inhibición de la unión de OSM humana a gp130 humano por 10G8, 9G2, 3E3 y 2B7. Se añadió un anticuerpo anti-OSM de ratón no competitivo (15E10) con fines comparativos. Se empleó un anticuerpo de trabajo como control negativo. Los datos mostrados son representativos de una de las cuatro repeticiones del ensayo.

Figura 2: Ensayo de células KB - Inhibición de la OSM humana por 10G8, 9G2, 3E3 y 2B7. Se añadió un anticuerpo anti-OSM de ratón no competitivo (15E10) con fines comparativos. Se empleó un anticuerpo de trabajo como control negativo. Los datos mostrados son representativos de una de las tres repeticiones del ensayo.

Figura 3: Ensayo de células KB - Inhibición de la OSM humana en presencia de suero AB humano al 25% por 10G8, 9G2, 3E3 y 2B7. Se añadió un anticuerpo anti-OSM de ratón no competitivo (15E10) con fines comparativos. Se empleó un anticuerpo de trabajo como control negativo. Los datos mostrados son representativos de una de las dos repeticiones del ensayo.

Figura 4: Ensayo de OSM y gp130 endógenos humanos - Inhibición de la unión de OSM humana endógena al gp130 humano por los anticuerpos 10G8, 9G2, 3E3 y 2B7. Se añadió un anticuerpo anti-OSM de ratón no competitivo (110) con fines comparativos. Se empleó un anticuerpo de trabajo como control negativo. Los datos mostrados son representativos de uno de los dos donantes.

Figura 5: Ensayo de células KB - Falta de inhibición de LIF humano por 10G8, 9G2, 3E3 y 2B7. Se añadió un anticuerpo anti-OSM de ratón no competitivo (15E10) con fines comparativos. Se empleó un mAb anti-LIF humano del mercado (R&D Systems, MAB250) como control positivo. Se empleó un anticuerpo de trabajo como control negativo.

Figura 6: KB Ensayo de células KB - Inhibición de la OSM de mono tití por 10G8, 9G2, 3E3 y 2B7. Se añadió un anticuerpo anti-OSM de ratón no competitivo (15E10) con fines comparativos. Se empleó un anticuerpo de trabajo

como control negativo. Los datos mostrados son representativos de una de las dos repeticiones del ensayo.

Figura 7: Comparación de las secuencias de VH de los hibridomas de 2B7, 3E3, 9G2 y 10G8. Los restos dentro de los cuadrados pequeños representan una diferencia de la mayoría. Los cuadrados grandes que abarcan secuencias representan la CDR.

- 5 Figura 8: Comparación de las secuencias de VL de los hibridomas de 2B7, 3E3, 9G2 y 10G8. Los restos dentro de los cuadrados pequeños representan una diferencia de la mayoría. Los cuadrados grandes que abarcan secuencias representan la CDR.

Figura 9: Análisis de la secuencia de las cadenas ligeras variables de 10G8, 9G2, 3E3 y 2B7 comparadas con un anticuerpo parental anti-OSM no competitivo 15E10.

- 10 Figura 10: Análisis de la secuencia de las cadenas pesadas variables de 10G8, 9G2, 3E3 y 2B7 comparadas con un anticuerpo parental anti-OSM no competitivo 15E10.

Figura 11: ELISA de unión de OSM humana directo - Comparación de la unión de OSM humana de las quimeras de 10G8 y 9G2 con la quimera de 15E10 (15E10c).

- 15 Figura 12: ELISA de gp130 humano - Inhibición de la unión de OSM humana a gp130 humano por 10G8, quimera de 10G8, 9G2 y quimera de 9G2. Se añadió un anticuerpo anti-OSM de ratón no competitivo (15E10) con fines comparativos. Se empleó un anticuerpo de trabajo como control negativo. Los datos mostrados son representativos de una de las tres repeticiones del ensayo.

- 20 Figura 13: Ensayo de células KB - Inhibición de la OSM humana por 10G8, quimera de 10G8, 9G2 y quimera de 9G2. Se añadió un anticuerpo anti-OSM de ratón no competitivo (15E10) con fines comparativos. Se empleó un anticuerpo de trabajo como control negativo. Los datos mostrados son representativos de una de las tres repeticiones del ensayo.

- 25 Figura 14: Ensayo de células KB - Inhibición de la OSM humana en presencia de suero AB humano al 25% por 10G8, quimera de 10G8, 9G2 y quimera de 9G2. Se añadió un anticuerpo anti-OSM de ratón no competitivo (15E10) con fines comparativos. Se empleó un anticuerpo de trabajo como control negativo. Los datos mostrados son representativos de una de las tres repeticiones del ensayo.

Figura 15: Ensayo de OSM y gp130 endógenos humanos - Inhibición de la unión de OSM humana endógena al gp130 humano por los anticuerpos 10G8, quimera de 10G8, 9G2 y quimera de 9G2. Se añadió un anticuerpo anti-OSM de ratón no competitivo (15E10) con fines comparativos. Se empleó un anticuerpo de trabajo como control negativo. Los datos mostrados son representativos de uno de los dos donantes.

- 30 Figura 16: Ensayo de células KB de LIF humano - No se produce inhibición del LIF humano por 10G8, quimera de 10G8, 9G2 y quimera de 9G2. Se añadió un anticuerpo anti-OSM de ratón no competitivo (15E10) con fines comparativos. Se empleó un anticuerpo anti-LIF humano (MAB250, R&D Systems) como control positivo. Se empleó un anticuerpo de trabajo como control negativo. Los datos mostrados son representativos de una de las tres repeticiones del ensayo.

- 35 Figura 17: Ensayo de células KB - Inhibición de la OSM humana por los variantes humanizados 10G8 L1 y L4. Se añadió 15E10h como comparación. Los datos mostrados son representativos de una de las tres repeticiones del ensayo.

- 40 Figura 18: ELISA de gp130 humano - Inhibición de la unión de OSM humana a gp130 humano por los variantes humanizados 10G8 H0L1, H1L1 y H2L1. Se añadió 15E10h como comparación. Se empleó un anticuerpo de trabajo como control negativo. Los datos mostrados son representativos de una de las dos repeticiones del ensayo.

Figura 19: Complejo de unión de OSM-mAb 10G8 - Unión de la OSM humana con la cadena ligera y la cadena pesada del mAb 10G8. Se muestran los sitios de unión del receptor de OSM (sitio II y sitio III). Se listan los restos aminoácidos importantes para las regiones de unión al receptor para cada sitio.

- 45 Figura 20: Ensayo de células KB - Inhibición de la OSM humana por los anticuerpos variantes 10G8 H0L1 CDRH1 y CDRL2. Se añadió 15E10h como comparación. Se empleó un anticuerpo de trabajo como control negativo. Los datos mostrados son representativos de una de las tres repeticiones del ensayo.

- 50 Figura 21: ELISA de gp130 humano - Inhibición de la unión de OSM humana a gp130 humano por 10G8 parental de ratón, quimera de 10G8, parental humanizado 10G8 H0L1 (H0L1), y H0(huCDRH1)L1. Se añadió 15E10h como comparación. Se empleó un anticuerpo de trabajo como control negativo. Los datos mostrados son representativos de una de las tres repeticiones del ensayo.

Figura 22: Ensayo de células KB - Inhibición de la OSM humana por 10G8 parental de ratón, quimera de 10G8, parental humanizado 10G8 H0L1 (H0L1), y H0(huCDRH1)L1. Se añadió 15E10h como comparación. Los datos mostrados son representativos de una de las tres repeticiones del ensayo.

- Figura 23: Ensayo de células KB - Inhibición de la OSM humana en presencia de suero AB humano al 25% por 10G8 parental de ratón, quimera de 10G8, parental humanizado 10G8 H0L1 (H0L1), y H0(H1)L1. Se añadió 15E10h como comparación. Se empleó un anticuerpo de trabajo como control negativo. Los datos mostrados son representativos de una de las dos repeticiones del ensayo.
- 5 Figura 24: Ensayo de OSM y gp130 endógenos humanos - Inhibición de la unión de OSM humana endógena al gp130 humano por 10G8 parental de ratón, quimera de 10G8, parental humanizado 10G8 H0L1 (H0L1), y H0(huCDRH1)L1. Se añadió 15E10h como comparación. Se empleó un anticuerpo de trabajo como control negativo. Los datos mostrados son representativos de uno de los cuatro donantes.
- 10 Figura 25: Ensayo de células KB de LIF humano - No se produce inhibición del LIF humano por 10G8 parental de ratón, quimera de 10G8, parental humanizado 10G8 H0L1 (H0L1), y H0(huCDRH1)L1. Se añadió 15E10h como comparación. Se empleó un anticuerpo anti-LIF humano (MAB250, R&D Systems) como control positivo. Se empleó un anticuerpo de trabajo como control negativo. Los datos mostrados son representativos de una de las tres repeticiones del ensayo.
- 15 Figura 26: Ensayo de hepatocitos primarios humanos - Inhibición de la liberación del amiloide A sérico (SAA) por H0(huCDRH1)L1 desde hepatocitos humanos estimulados con (A) 3 ng/ml, y (B) 10 ng/ml de OSM humana. Se añadió 15E10 humanizado con fines comparativos. Los datos mostrados son representativos de uno de los tres donantes de hepatocitos.
- 20 Figura 27: Ensayo de hepatocitos primarios humanos - Inhibición de la liberación de proteína C reactiva (CRP) por H0(huCDRH1)L1 desde hepatocitos humanos estimulados con (A) 3 ng/ml, y (B) 10 ng/ml de OSM humana. Se añadió 15E10 humanizado con fines comparativos. Los datos mostrados son representativos de uno de los tres donantes de hepatocitos.
- 25 Figura 28: Ensayo de células similares a fibroblastos de AR humanos - Inhibición de la liberación de IL-6 por H0(huCDRH1)L1 desde células de sinoviocitos similares a fibroblastos de AR humanos (HFLS-RA) estimulados con (A) 0,3 ng/ml, y (B) 3 ng/ml de OSM humana. Se añadió 15E10 humanizado con fines comparativos. Los datos mostrados son representativos de uno de los tres donantes de HFLS-RA.
- Figura 29: Ensayo de células similares a fibroblastos de AR humanos - Inhibición de la liberación de MCP-1 por H0(huCDRH1)L1 desde células de sinoviocitos similares a fibroblastos de AR humanos (HFLS-RA) estimulados con (A) 0,3 ng/ml, y (B) 3 ng/ml de OSM humana. Se añadió 15E10 humanizado con fines comparativos. Los datos mostrados son representativos de uno de los tres donantes de HFLS-RA.
- 30 Figura 30: Ensayo de células endoteliales de vena umbilical humanas - Inhibición de la liberación de IL-6 por H0(huCDRH1)L1 desde células endoteliales de vena umbilical humanas estimuladas con (A) 30 ng/ml, y (B) 100 ng/ml de OSM humana. Se añadió 15E10 humanizado con fines comparativos. Los datos mostrados son representativos de una de las tres repeticiones del ensayo.
- 35 Figura 31: Ensayo de fibroblastos de pulmón humanos - Inhibición de la liberación de MCP-1 por H0(huCDRH1)L1 desde fibroblastos de pulmón humanos estimulados con OSM humana. Se añadió 15E10 humanizado con fines comparativos. Los datos mostrados son representativos de (A) un donante sano, y (B) un donante con IPF.
- 40 Figura 32: Ensayo de fibroblastos de pulmón humanos - Inhibición de la liberación de IL-6 por H0(huCDRH1)L1 desde fibroblastos de pulmón humanos estimulados con OSM humana. Se añadió 15E10 humanizado (denominado anticuerpo X) con fines comparativos. Los datos mostrados son representativos de (A) un donante sano, y (B) un donante con IPF.
- Figura 33: Datos de unión de variantes de CDRH3 - Se realizó una selección con alanina de los restos encontrados en CDRH3. Los datos proporcionados muestran el modo en que la afinidad de unión se ve afectada por un cambio en este resto.
- Figura 34: Ilustración de la interacción entre hOSM y gp130, LIFR y OSMR.
- 45 Nomenclatura de los anticuerpos - Para evitar dudas, 15E10h y 15E10 humanizado se relacionan con el mismo anticuerpo y se denominan anticuerpo X en algunas figuras. También 10G8/A9 y 10G8 se relacionan con el mismo anticuerpo.

Sumario de la invención

- 50 Se describen proteínas de unión a antígenos que son capaces de unirse a OSM, por ejemplo, anticuerpos que se unen específicamente a OSM y que inhiben la unión de OSM al receptor gp130, pero no interaccionan directamente con los restos del sitio II.

Los anticuerpos de OSM de la presente invención están relacionados o se derivan de un mAb murino 10G8. La región variable de cadena pesada del anticuerpo 10G8 murino se proporciona como SEQ ID NO:26, y la región variable de cadena ligera del anticuerpo 10G8 murino se proporciona como SEQ ID NO:28.

Las regiones variables de cadena pesada (VH) de la presente invención pueden comprender las siguientes CDR o variantes de estas CDR (según se define por Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH, 1987)):

CDRH1 de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:77,

5 CDRH2 de SEQ ID NO:2,

CDRH3 de SEQ ID NO:3.

Las regiones variables de cadena ligera (VL) de a presente invención pueden comprender las siguientes CDR o variantes de estas CDR (según se define por Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH, 1987)):

10 CDRL1 de SEQ ID NO:4,

CDRL2 de SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:78,

CDRL3 de SEQ ID NO:6.

15 La invención también proporciona una secuencia polinucleotídica que codifica una cadena pesada de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente, y un polinucleótido que codifica una cadena ligera de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente. Estos polinucleótidos representan la secuencia codificadora que se corresponde con las secuencias polipeptídicas equivalentes, aunque se entenderá que dichas secuencias polinucleotídicas pueden clonarse en un vector de expresión junto con un codón de inicio, una secuencia señal apropiada y un codón de fin.

20 La invención también proporciona una célula hospedante transfectada o transformada recombinante que comprende uno o más polinucleótidos que codifican una cadena pesada y/o una cadena ligera de cualquiera de las proteínas de unión a antígenos descritas en la presente.

25 También se describe un método para la producción de cualquiera de las proteínas de unión a antígenos descritas en la presente, comprendiendo dicho método la etapa de cultivar una célula hospedante que comprende un primer y un segundo vector, comprendiendo dicho primer vector un polinucleótido que codifica una cadena pesada de cualquiera de las proteínas de unión a antígenos descritas en la presente, y comprendiendo dicho segundo vector un polinucleótido que codifica una cadena ligera de cualquiera de las proteínas de unión a antígenos descritas en la presente, en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, un medio de cultivo sin suero.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, según se describe en la presente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 En otro aspecto, se describe un método de tratamiento o profilaxis de una enfermedad o un trastorno que responde a la modulación de la interacción entre hOSM y gp130, comprendiendo dicho método la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de su proteína de unión al antígeno, según se describe en la presente.

35 Por tanto, un objeto de la presente invención consiste en proporcionar una estrategia terapéutica para el tratamiento de la AR y otras enfermedades y trastornos, en particular enfermedades y trastornos inflamatorios crónicos, tales como la osteoartritis, la fibrosis pulmonar idiopática, el dolor, la enfermedad inflamatoria del pulmón, la enfermedad cardiovascular y la psoriasis. En particular, un objeto de la presente invención es proporcionar inmunoglobulinas, en especial anticuerpos que se unen específicamente a OSM (por ejemplo, hOSM, en particular su sitio II) y que modulan (es decir, inhiben o bloquean) la interacción entre OSM y gp130 en el tratamiento de enfermedades y trastornos que responde a la modulación de esta interacción.

40 En otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para tratar un paciente humano que padece una enfermedad o un trastorno inflamatorio, comprendiendo dicho método la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos, según se describen en la presente.

45 En otro aspecto se describe un método para humanizar un anticuerpo, comprendiendo dicho método las etapas de obtener un anticuerpo no humano que se une a un antígeno diana, obtener la estructura cristalográfica del cocrystal de anticuerpo-antígeno, determinar hasta aproximadamente 2-5 Å a partir de la estructura cristalina los restos del anticuerpo no humano implicado directamente en la unión al antígeno, mutar uno o más de los restos no implicados en la unión a un resto derivado de una secuencia humana, y recuperar dicho anticuerpo.

Descripción detallada de la invención

50 Se describe una proteína de unión a antígenos que se une específicamente a OSM, por ejemplo, que se une específicamente a OSM humana (hOSM) y que inhibe la unión de OSM al receptor gp130, pero que no interacciona directamente con los restos del sitio II.

En otro aspecto, tal como se describe en la presente, la proteína de unión a antígenos no se une directamente a los restos Q20, G120, Q16, N124.

5 En otro aspecto, tal como se describe en la presente, se proporciona una proteína de unión a antígenos que se une específicamente a OSM, por ejemplo, que se une específicamente a OSM humana (hOSM) y que inhibe la unión de OSM al receptor gp130 y que interacciona con uno o más de los restos 82, 83, 84, 90, 94, 112, 115, 122, 123, 152 de huOSM.

10 En uno de estos aspectos, se describe una proteína de unión a antígenos que se une específicamente a OSM, por ejemplo, que se une específicamente a OSM humana (hOSM) y que inhibe la unión de OSM al receptor gp130, pero que no interacciona directamente con los restos del sitio II, y que no compite con un anticuerpo que tiene una cadena pesada de SEQ ID NO:79 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 80 en un ensayo ELISA de competición.

En uno de estos aspectos, la solicitud describe una proteína de unión a antígenos que compite con la proteína de unión a antígenos, según se describe en la presente, por la unión a OSM, por ejemplo, a OSM humana.

15 En otro aspecto, el anticuerpo según la invención se une a OSM humana con alta afinidad, por ejemplo, cuando se mide con un ensayo Biacore, la proteína de unión a antígenos se une a la OSM humana con una afinidad de 500 pM o menor, o una afinidad de 400 pM o menor, o de 300 pM o menor, o de 250 pM o menor, o de 200 pM o menor, o, por ejemplo, de 140 pM o menor. En otra realización, la proteína de unión a antígenos se une a la OSM humana, cuando se mide mediante el ensayo Biacore, de entre aproximadamente 100 pM y aproximadamente 500 pM, o de entre aproximadamente 100 pM y aproximadamente 300 pM, o de entre aproximadamente 100 pM y aproximadamente 250 pM, o de entre aproximadamente 100 pM y aproximadamente 200pM. En una realización de la presente invención, la proteína de unión a antígenos se une a OSM con una afinidad menor que 250 pm. En otra realización de la presente invención, la proteína de unión a antígenos se une a OSM con una afinidad menor que 140 pm.

En una de estas realizaciones, esto se mide mediante Biacore, por ejemplo como se indica en el ejemplo 1.2.2.

25 En otro aspecto, los anticuerpos de la presente invención se unen a OSM humana con alta afinidad, por ejemplo, cuando se mide mediante el método de Kinexa basado en una disolución, la proteína de unión a antígenos se une a OSM humana con una afinidad de 200 pM o menor, o con una afinidad de 150 pM o menor, o de 100 pM o menor, o de 50 pM o menor, o, por ejemplo, de 40 pM o menor. En otra realización, la proteína de unión a antígenos se une a la OSM humana, cuando se mide mediante Kinexa, de entre aproximadamente 10 pM y aproximadamente 200 pM, o de entre aproximadamente 10 pM y aproximadamente 150 pM, o de entre aproximadamente 10 pM y aproximadamente 100 pM, o de entre aproximadamente 10 pM y aproximadamente 70 pM, o de entre aproximadamente 10 pM y aproximadamente 40 pM. En una realización de la presente invención, la proteína de unión a antígenos se une a OSM con una afinidad menor que 70 pm. En otra realización de la presente invención, la proteína de unión a antígenos se une a OSM con una afinidad menor que 40 pm.

En una de estas realizaciones, esto se mide mediante Kinexa, por ejemplo como se indica en el ejemplo 1.2.2.

35 En otro aspecto, los anticuerpos de la invención se unen a la OSM humana y neutralizan la OSM en un ensayo de neutralización de células en el que la proteína de unión a antígenos tiene una CI50 de entre aproximadamente 10 pM y aproximadamente 200 pM, o de entre aproximadamente 10 pM y aproximadamente 150 pM, o de entre aproximadamente 10 pM y aproximadamente 100 pM, o de entre aproximadamente 20 pM y aproximadamente 100 pM, o de entre aproximadamente 20 pM y aproximadamente 100pM. En otra realización de la presente invención, la proteína de unión a antígenos se une a OSM y neutraliza la OSM en un ensayo de neutralización de células en el que la proteína de unión a antígenos tiene una CI50 de aproximadamente 20 pM con una afinidad menor que 140 pm.

En una de estas realizaciones, esto se mide mediante un ensayo de neutralización de células, por ejemplo como se indica en el ejemplo 2, sección 2.2.1.

45 Se describen proteínas de unión a antígenos que comprenden CDRH3 de SEQ ID NO:3, o un variante de SEQ ID NO:3 en el que la CDRH3 está sustituida por los aminoácidos alternativos indicados a continuación en una o más de las siguientes posiciones (empleando la numeración de Kabat):

La posición 95 está sustituida por Ala, Glu, Gly, His, Leu, Met, Pro, Gln, Ser, Thr o Val.

La posición 96 está sustituida por Ala, Cys, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Ser, Thr, Trp o Tyr.

50 La posición 97 está sustituida por Ala, Cys, Phe, Met o Ser.

La posición 98 está sustituida por Ala, Asp, Phe, Gly, Leu, Pro, Gln o Trp.

La posición 99 está sustituida por Ala, Cys, Pro, Ser, Val o Tyr.

La posición 100B está sustituida por Glu.

La posición 100C está sustituida por Ala, Glu, Phe, Gly, Val o Trp.

La posición 100D está sustituida por Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Leu, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr.

La posición 101 está sustituida por Glu, Gly, Ser, Thr o Val.

La posición 102 está sustituida por Ala, Phe, Gly, Leu, Pro, Gln, Arg, Ser Tyr, His, Ile, Asp o Trp.

5 Se describe la proteína de unión a antígenos que comprende:

i) CDRH3, tal como se indica en SEQ ID NO:3, o un variante de SEQ ID NO:3 en el que Val102 está sustituido por Tyr, His, Ile, Ser, Asp o Gly.

10 ii) CDRH2, tal como se indica en SEQ ID NO:2, o un variante de SEQ ID NO:2 en el que Thr50 está sustituido por Gly, Tyr, Phe, Ile, Glu o Val y/o Ile51 está sustituido por Leu, Val, Thr, Ser o Asn y/o Ser52 está sustituido por Phe, Trp o His y/o Gly53 está sustituido por Asp, Ser o Asn y/o Gly54 está sustituido por Ser y/o Phe56 está sustituido por Ser, Tyr, Thr, Asn, Asp o Arg y/o Tyr58 está sustituido por Gly, His, Phe, Asp o Asn.

15 iii) CDRL1, tal como se indica en SEQ ID NO:4, o un variante de SEQ ID NO:4 en el que Ser27A está sustituido por Asn, Asp, Thr o Glu y/o Ser27C está sustituido por Asp, Leu, Tyr, Val, Ile, Asn, Phe, His, Gly o Thr y/o Asn31 está sustituido por Ser, Thr, Lys o Gly y/o Phe32 está sustituido por Tyr, Asn, Ala, His, Ser o Arg y/o Met33 está sustituido por Leu, Val, Ile o Phe.

iv) CDRL3, tal como se indica en SEQ ID NO:6, o un variante de SEQ ID NO:6 en el que Leu89 está sustituido por Gln, Ser, Gly o Phe y/o His90 está sustituido por Gln o Asn, Ser91 está sustituido por Asn, Phe, Gly, Arg, Asp, His, Thr, Tyr o Val y/o Arg92 está sustituido por Asn, Tyr, Trp, Thr, Ser, Gln, His, Ala o Asp y/o Glu93 está sustituido por Asn, Gly, His, Thr, Ser, Ar o Ala y/o Phe96 está sustituido por Pro, Leu, Tyr, Arg, Ile o Trp.

20 En otro aspecto, la proteína de unión a antígenos comprende además:

v) CDRL2, tal como se indica en SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:78.

En otro aspecto, la proteína de unión a antígenos comprende además:

25 vi) CDRH1, tal como se indica en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:77, o un variante de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:77 en el que Tyr32 está sustituido por Ile, His, Phe, Thr, Asn, Cys, Glu o Asp y/o Ala33 está sustituido por Tyr, Trp, Gly, Thr, Leu o Val y/o Met34 está sustituido por Ile, Val o Trp y/o Ser35 está sustituido por His, Glu, Asn, Gln, Tyr o Thr.

30 Las secuencias de CDR variantes para las L1, L2, L3, H1 y H2 de las CDR se han determinado empleando mutagénesis y/o tecnología canónica. Las L1, L2, L3, H1 y H2 de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) tienden a mostrar estructuralmente una de un número finito de conformaciones de la cadena principal. La clase de estructura canónica concreta de una CDR se define por la longitud de la CDR y por la compactación de los bucles determinada por restos localizados en posiciones clave en la CDR y en las regiones de marco (restos determinantes de la estructura o SDR). Martin y Thornton (1996, J. Mol. Biol., 263:800-815) han generado un método automático para definir los moldes canónicos de "restos clave". Se emplea el análisis de Cluster para definir las clases canónicas para conjuntos de CDR, y después se identifican los moldes canónicos mediante el análisis de restos hidrófobos de unión a hidrógeno enterrados y las glicinas y prolina conservadas. Las CDR de las secuencias de los anticuerpos pueden asignarse a clases canónicas comparando las secuencias con moldes de restos clave y puntuando cada molde empleando matrices de identidad o similitud.

35 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende CDRH3 de SEQ ID NO:3, CDRH2: SEQ ID NO:2, CDRL1: SEQ ID NO:4 y CDRL3: SEQ ID NO:6, y puede comprender además CDRH1 de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:77, y CDRL2: SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:78.

40 En otro aspecto, la proteína de unión a antígenos comprende CDRH3 de SEQ ID NO:3, CDRH2: SEQ ID NO:2, CDRL1: SEQ ID NO:4, CDRL2: SEQ ID NO:5 y CDRL3: SEQ ID NO:6.

En otro aspecto, la proteína de unión a antígenos comprende CDRH3 de SEQ ID NO:3, CDRH2: SEQ ID NO:2, CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRL1: SEQ ID NO:4, CDRL2: SEQ ID NO:5 y CDRL3: SEQ ID NO:6.

45 En otro aspecto, la proteína de unión a antígenos comprende CDRH3 de SEQ ID NO:3, CDRH2: SEQ ID NO:2, CDRH1 de SEQ ID NO:1, CDRL1: SEQ ID NO:4, CDRL2: SEQ ID NO:78, y CDRL3: SEQ ID NO:6.

En otro aspecto, la proteína de unión a antígenos comprende CDRH3 de SEQ ID NO:3, CDRH2: SEQ ID NO:2, CDRH1 de SEQ ID NO:77, CDRL1: SEQ ID NO:4, CDRL2: SEQ ID NO:5 y CDRL3: SEQ ID NO:6.

En otro aspecto, la proteína de unión a antígenos comprende CDRH3 de SEQ ID NO:3, CDRH2: SEQ ID NO:2, CDRH1 de SEQ ID NO:77, CDRL1: SEQ ID NO:4, CDRL2: SEQ ID NO:78, y CDRL3: SEQ ID NO:6.

50 En un aspecto de la presente invención, la proteína de unión a antígenos no interacciona directamente a través de

CDRH1 con OSM.

En un aspecto, la proteína de unión a antígenos no interacciona directamente a través de CDRH1 o CDRL2 con OSM.

5 Las proteínas de unión a antígeno descritas en la presente solicitud pueden comprender regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera formateadas en la estructura de un anticuerpo natural, o de uno de sus fragmentos funcionales o equivalentes. Por tanto, una proteína de unión a antígenos puede comprender las regiones VH formateadas en un anticuerpo de longitud completa, un fragmento (Fab')₂, un fragmento Fab, o uno de sus equivalentes (tales como scFV, bi- tri- o tetracuerpos, Tandabs etc.), cuando se aparean con una cadena ligera apropiada. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser una IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4; o IgM; IgA, IgE
10 o IgD, o uno de sus variantes modificados.

El dominio constante de la cadena pesada del anticuerpo puede seleccionarse en consecuencia. El dominio constante de cadena ligera puede ser un dominio constante kappa o lambda. Además, la proteína de unión a antígenos puede comprender modificaciones de todas clases, por ejemplo, dímeros de IgG, mutantes de Fc que ya no se unen a receptores de Fc o que median en la unión de C1q. La proteína de unión a antígenos también puede ser un anticuerpo quimérico del tipo descrito en el documento WO86/01533 que comprende una región de unión al antígeno y una región que no es de inmunoglobulina.

La región constante se selecciona según cualquier funcionalidad requerida. Una IgG1 puede mostrar capacidad lítica a través de la unión al complemento y/o mediará en la ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos). Puede emplearse una IgG4 si se requiere un anticuerpo bloqueante no citotóxico. Sin embargo, los anticuerpos IgG4 pueden mostrar inestabilidad durante su producción y, por tanto, una alternativa es modificar una IgG1, que en general es más estable. Las modificaciones sugeridas se describen en el documento EP0307434, por ejemplo, mutaciones en las posiciones 235 y 237. Por tanto, se describe una forma lítica o no lítica de una proteína de unión a antígenos, por ejemplo, un anticuerpo según la invención.

En ciertas formas, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo de IgG1 no lítico o lítico de longitud completa (por ejemplo, tetrámero de H2L2) que posee cualquiera de las regiones variables de cadena pesada descritas en la presente.

Las proteínas de unión a antígenos descritas se derivan del anticuerpo murino que tiene las regiones variables descritas en SEQ ID NO:26 y SEQ ID NO:28 o sus equivalente no murinos, tales como sus variantes de rata, humanas, quiméricas o humanizadas, por ejemplo, derivadas del anticuerpo humanizado que tienen las cadenas pesada y ligera descritas en SEQ ID NO:54 y SEQ ID NO:62.

En un aspecto, se describe una proteína de unión a antígenos que comprende un dominio variable de cadena pesada aislado seleccionado de cualquiera de los siguientes: SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58 o SEQ ID NO:74.

En otro aspecto, se describe una proteína de unión a antígenos que comprende un dominio variable de cadena ligera aislado seleccionado de cualquiera de los siguientes: SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66 o SEQ ID NO:68.

En otro aspecto, se describe una proteína de unión a antígenos que comprende un dominio variable de cadena pesada aislado seleccionado de cualquiera de los siguientes: SEQ ID NO:54, SEQ ID NO:56, SEQ ID NO:58 o SEQ ID NO:74, y un dominio variable de cadena ligera aislado seleccionado de cualquiera de los siguientes: SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:64, SEQ ID NO:66 o SEQ ID NO:68.

En otra realización de la solicitud se describe una proteína de unión a antígenos que comprende un dominio variable de cadena pesada aislado de SEQ ID NO:54 y un dominio variable de cadena ligera aislado de SEQ ID NO:62. En otra realización de la invención, tal como se describe en la presente, la proteína de unión a antígenos comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:74, y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:62.

45 También se describe una proteína de unión a antígenos que comprende una región variable de cadena pesada codificada por SEQ ID NO:53, y una región variable de cadena ligera codificada por SEQ ID NO:61.

En un aspecto de la invención, se proporciona una proteína de unión a antígenos que comprende una región variable de cadena pesada codificada por SEQ ID NO:73, y una región variable de cadena ligera codificada por SEQ ID NO:61.

50 En un aspecto, se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena pesada variable aislada, comprendiendo dicho polinucleótido la SEQ ID NO:53, o la SEQ ID NO:55, o la SEQ ID NO:57, o la SEQ ID NO:73.

En un aspecto, se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena ligera variable aislada, comprendiendo dicho polinucleótido la SEQ ID NO:61, o la SEQ ID NO:63, o la SEQ ID NO:65, o la SEQ ID NO:67. En otro aspecto, se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena pesada variable aislada, comprendiendo dicho

- polinucleótido la SEQ ID NO:53, o la SEQ ID NO:73, y un polinucleótido que codifica una cadena ligera variable aislada, comprendiendo dicho polinucleótido la SEQ ID NO:61, o la SEQ ID NO:63, o la SEQ ID NO:65, o la SEQ ID NO:67. En otro aspecto, se proporciona un polinucleótido que codifica una cadena pesada variable aislada, comprendiendo dicho polinucleótido la SEQ ID NO:53, o la SEQ ID NO:73, y un polinucleótido que codifica una
- 5 cadena ligera variable aislada, comprendiendo dicho polinucleótido la SEQ ID NO:61.
- En otro aspecto, la proteína de unión a antígenos puede comprender una cualquiera de las cadenas pesadas variables, según se describen en la presente, en combinación con una cualquiera de las cadenas ligeras, según se describen en la presente.
- En un aspecto, la proteína de unión a antígenos es un anticuerpo que comprende una o más CDR según la invención descrita en la presente, o uno o ambos de los dominios variables de cadena pesada o ligera según la invención descrita en la presente. En una realización, el anticuerpo se une a OSM de primate. En dicha realización, el anticuerpo se une además a una OSM de primate no humana, por ejemplo, la OSM de mono macaco cynomolgus. En otra realización, el anticuerpo se une a OSM de mono tití.
- En un aspecto se proporciona un anticuerpo que se une a OSM humana y de mono tití con una afinidad mayor que 1
- 15 nM cuando se mide mediante Biacore o Kinexa.
- La capacidad de estos anticuerpos para neutralizar la OSM de mono tití proporciona un medio exclusivo para evaluar el papel de la OSM en modelos de enfermedad de mono tití, tales como el modelo EAE de MS, para indicaciones adicionales. En otro aspecto, la proteína de unión a antígenos se selecciona del grupo que consiste en un dAb, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, díacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, minianticuerpo y minicuerpo.
- En un aspecto de la presente invención, la proteína de unión a antígenos es un anticuerpo humanizado o quimérico, y en otro aspecto el anticuerpo está humanizado.
- 20 En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- Por tanto, en un aspecto de la invención se proporciona un anticuerpo que se une específicamente a OSM y que inhibe la unión de OSM al receptor gp130, pero no interacciona directamente con los restos del sitio II, y en el que el anticuerpo comprende CDRH3 de SEQ ID NO:3 o un variante de SEQ ID NO:3, en el que la posición 98 está sustituida por Leu, y en el que el anticuerpo comprende:
- 25 i) CDRH2, tal como se indica en SEQ ID NO:2,
- ii) CDRL1, tal como se indica en SEQ ID NO:4, y
- iii) CDRL3, tal como se indica en SEQ ID NO:6,
- 30 y en el que el anticuerpo se une a OSM humana y de mono tití con una afinidad mayor que 1 nM cuando se mide mediante Biacore o Kinexa.
- La presente solicitud divulga además que, en un aspecto, la proteína de unión a antígenos comprende:
- i) CDRH3, tal como se indica en SEQ ID NO:3, o un variante de SEQ ID NO:3 en el que la CDRH3 está sustituida por los aminoácidos alternativos indicados a continuación en una o más de las siguientes posiciones (empleando la numeración de Kabat):
- 35 La posición 95 está sustituida por Ala, Glu, Gly, His, Leu, Met, Pro, Gln, Ser, Thr, o Val.
- La posición 96 está sustituida por Ala, Cys, Phe, Gly, His, Lys, Leu, Ser, Thr, Trp o Tyr.
- La posición 97 está sustituida por Ala, Cys, Phe, Met o Ser.
- La posición 98 está sustituida por Ala, Asp, Phe, Gly, Leu, Pro, Gln o Trp.
- 40 La posición 99 está sustituida por Ala, Cys, Pro, Ser, Val o Tyr.
- La posición 100B está sustituida por Glu.
- La posición 100C está sustituida por Ala, Glu, Phe, Gly, Val o Trp.
- La posición 100D está sustituida por Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Leu, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr.
- La posición 101 está sustituida por Glu, Gly, Ser, Thr o Val.
- 45 La posición 102 está sustituida por Ala, Phe, Gly, Leu, Pro, Gln, Arg, Ser Tyr, His, Ile, Asp o Trp.
- ii) CDRH1, tal como se indica en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:77, o un variante de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:77, en

el que Tyr32 está sustituido por Ile, His, Phe, Thr, Asn, Cys, Glu o Asp y/o Ala33 está sustituido por Tyr, Trp, Gly, Thr, Leu o Val y/o Met34 está sustituido por Ile, Val o Trp y/o Ser35 está sustituido por His, Glu, Asn, Gln, Tyr o Thr.

5 iii) CDRH2, tal como se indica en SEQ ID NO:2, o un variante de SEQ ID NO:2 en el que Thr50 está sustituido por Gly, Tyr, Phe, Ile, Glu o Val y/o Ile51 está sustituido por Leu, Val, Thr, Ser o Asn y/o Ser52 está sustituido por Phe, Trp o His y/o Gly53 está sustituido por Asp, Ser o Asn y/o Gly54 está sustituido por Ser y/o Phe56 está sustituido por Ser, Tyr, Thr, Asn, Asp o Arg y/o Tyr58 está sustituido por Gly, His, Phe, Asp o Asn.

10 iv) CDRL1, tal como se indica en SEQ ID NO:4, o un variante de SEQ ID NO:4 en el que Ser27A está sustituido por Asn, Asp, Thr o Glu y/o Ser27C está sustituido por Asp, Leu, Tyr, Val, Ile, Asn, Phe, His, Gly o Thr y/o Asn31 está sustituido por Ser, Thr, Lys o Gly y/o Phe32 está sustituido por Tyr, Asn, Ala, His, Ser o Arg y/o Met33 está sustituido por Leu, Val, Ile o Phe.

v) CDRL2, tal como se indica en SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:78.

15 vi) CDRL3, tal como se indica en SEQ ID NO:6, o un variante de SEQ ID NO:6 en el que Leu89 está sustituido por Gln, Ser, Gly o Phe y/o His90 está sustituido por Gln o Asn, Ser91 está sustituido por Asn, Phe, Gly, Arg, Asp, His, Thr, Tyr o Val y/o Arg92 está sustituido por Asn, Tyr, Trp, Thr, Ser, Gln, His, Ala o Asp y/o Glu93 está sustituido por Asn, Gly, His, Thr, Ser, Ar o Ala y/o Phe96 está sustituido por Pro, Leu, Tyr, Arg, Ile o Trp.

vii) el marco de cadena pesada que comprende los siguientes restos:

Posición 2: Val, Ile o Gly

Posición 4: Leu o Val

Posición 20: Leu, Ile, Met o Val

20 Posición 22: Cys

Posición 24: Thr, Ala, Val, Gly o Ser

Posición 26: Gly

Posición 29: Ile, Phe, Leu o Ser

Posición 36: Trp

25 Posición 47: Trp

Posición 48: Ile, Met, Val o Leu

Posición 69: Ile, Leu, Phe, Met o Val

Posición 71: Arg

Posición 78: Ala, Leu, Val, Tyr o Phe

30 Posición 80: Leu, Met

Posición 90: Tyr o Phe

Posición 92: Cys

Posición 94: Arg, Lys, Gly, Ser, His o Asn

La presente invención divulga además que, en un aspecto, la proteína de unión a antígenos comprende:

35 i) CDRH3, tal como se indica en SEQ ID NO:3,

ii) CDRH1, tal como se indica en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:77,

iii) CDRH2, tal como se indica en SEQ ID NO:2,

iv) CDRL1, tal como se indica en SEQ ID NO:4,

v) CDRL2, tal como se indica en SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:78,

40 vi) CDRL3, tal como se indica en SEQ ID NO:6,

vii) el marco de cadena pesada que comprende los siguientes restos:

Posición 2: Val, Ile o Gly

Posición 4: Leu o Val

Posición 20: Leu, Ile, Met o Val

Posición 22: Cys

5 Posición 24: Thr, Ala, Val, Gly o Ser

Posición 26: Gly

Posición 29: Ile, Phe, Leu o Ser

Posición 36: Trp

Posición 47: Trp

10 Posición 48: Ile, Met, Val o Leu

Posición 69: Ile, Leu, Phe, Met o Val

Posición 71: Arg

Posición 78: Ala, Leu, Val, Tyr o Phe

Posición 80: Leu, Met

15 Posición 90: Tyr o Phe

Posición 92: Cys

Posición 94: Arg, Lys, Gly, Ser, His o Asn

La presente invención divulga además que, en un aspecto, la proteína de unión a antígenos comprende:

i) CDRH3, tal como se indica en SEQ ID NO:3,

20 ii) CDRH1, tal como se indica en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:77,

iii) CDRH2, tal como se indica en SEQ ID NO:2,

iv) CDRL1, tal como se indica en SEQ ID NO:4,

v) CDRL2, tal como se indica en SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:78,

vi) CDRL3, tal como se indica en SEQ ID NO:6,

25 vii) el marco de cadena pesada que comprende los siguientes restos:

Posición 2: Val

Posición 4: Leu

Posición 20: Leu

Posición 22: Cys

30 Posición 24: Ala

Posición 26: Gly

Posición 29: Phe

Posición 36: Trp

Posición 47: Trp

35 Posición 48: Val

Posición 69: Ile

Posición 71: Arg

Posición 78: Leu

Posición 80: Leu

Posición 90: Tyr

Posición 92: Cys

5 Posición 94: Arg

La presente invención divulga además que, en un aspecto, la proteína de unión a antígenos comprende:

i) CDRH3, tal como se indica en SEQ ID NO:3,

ii) CDRH1, tal como se indica en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:77,

iii) CDRH2, tal como se indica en SEQ ID NO:2,

10 iv) CDRL1, tal como se indica en SEQ ID NO:4,

v) CDRL2, tal como se indica en SEQ ID NO:5 o SEQ ID NO:78,

vi) CDRL3, tal como se indica en SEQ ID NO:6,

vii) el marco de cadena pesada que comprende los siguientes restos:

Posición 2: Val

15 Posición 4: Leu

Posición 20: Leu

Posición 22: Cys

Posición 24: Ala

Posición 26: Gly

20 Posición 29: Phe

Posición 36: Trp

Posición 47: Trp

Posición 48: Leu

Posición 69: Ile, Leu, Phe, Met o Val

25 Posición 71: Arg

Posición 78: Ala

Posición 80: Leu, Met

Posición 90: Tyr o Phe

Posición 92: Cys

30 Posición 94: Arg, Lys, Gly, Ser, His o Asn

Las proteínas de unión a antígenos, por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención, pueden producirse mediante transfección de una célula hospedante con un vector de expresión que comprende la secuencia codificadora de la proteína de unión a antígenos de la invención. Se produce un vector de expresión o un plásmido recombinante colocando estas secuencias codificadoras de la proteína de unión a antígenos en asociación operativa con secuencias de control reguladoras convencionales capaces de controlar la replicación y la expresión en una célula hospedante y/o la secreción desde una célula hospedante. Las secuencias reguladoras incluyen secuencias de promotor, por ejemplo, promotor de CMV, y secuencias señal que pueden derivarse de otros anticuerpos conocidos. De modo similar, puede producirse un segundo vector de expresión que presenta una secuencia de ADN que codifica una cadena ligera o pesada de una proteína de unión a antígenos complementaria. En ciertas realizaciones, este segundo vector de expresión es idéntico al primero, excepto en lo que se refiere a las secuencias codificadoras y los marcadores seleccionables, para asegurar en la medida de lo posible que cada cadena

35

40

polipeptídica se exprese de modo funcional. Como alternativa, las secuencias codificadoras de cadena pesada y ligera para la proteína de unión a antígenos pueden residir en un único vector.

5 Una célula hospedante seleccionada se cotransfecta mediante técnicas convencionales con el primer y el segundo vector (o simplemente se transfecta con un único vector) para crear la célula hospedante transfectada de la invención que comprende las cadenas ligera y pesada sintéticas o recombinantes. Después la célula transfectada se cultiva mediante técnicas convencionales para producir los anticuerpos modificados de la invención. Los anticuerpos que incluyen la asociación de la cadena ligera y/o la cadena pesada recombinante se seleccionan de un cultivo mediante un ensayo apropiado, tal como ELISA o RIA. Pueden emplearse técnicas convencionales similares para construir otras proteínas de unión a antígenos.

10 Los vectores adecuados para las etapas de clonación y subclonación empleados en los métodos y en la construcción de las composiciones de esta invención pueden ser seleccionados por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede emplearse la serie pUC convencional de vectores de clonación. Un vector, pUC19, está disponible en el mercado en empresas suministradoras, tales como Amersham (Buckinghamshire, Reino Unido) o Pharmacia (Uppsala, Suecia). Además, cualquier vector que sea capaz de replicarse con facilidad, que tenga un gran número de sitios de clonación y genes seleccionables (por ejemplo, resistencia a antibióticos) y que pueda manipularse con facilidad puede usarse para la clonación. Así, la selección del vector de clonación no es un factor limitante en esta invención.

20 Los vectores de expresión también pueden caracterizarse por medio de los genes adecuados para amplificar la expresión de secuencias de ADN heterólogas, por ejemplo, el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) de mamíferos. Otras secuencias de vectores incluyen una secuencia señal de poli A, tal como la procedente de la hormona de crecimiento bovina (BGH) y la secuencia del promotor de betaglobina (betaglopro). Los vectores de expresión útiles en la presente pueden sintetizarse mediante técnicas muy conocidas por los expertos en la técnica.

25 Los componentes de dichos vectores, por ejemplo, replicones, genes de selección, potenciadores, promotores, secuencias señal y similares, pueden obtenerse de fuentes comerciales o naturales o pueden sintetizarse mediante procedimientos conocidos para su uso en la dirección de la expresión y/o la secreción del producto del ADN recombinante en un hospedante seleccionado. Para este fin también pueden seleccionarse otros vectores de expresión apropiados, y en la técnica se conocen numerosos tipos para la expresión en mamíferos, bacteriana, en insectos, en levaduras y fúngica.

30 La presente invención también incluye una línea celular transfectada con un plásmido recombinante que contiene las secuencias codificadoras de las proteínas de unión a antígenos de la presente invención. Las células hospedantes útiles para la clonación y otras manipulaciones de estos vectores de clonación también son convencionales. Sin embargo, pueden emplearse células de diversas cepas de *E. coli* para la replicación de los vectores de clonación y otras etapas en la construcción de los anticuerpos de esta invención.

35 Las células hospedantes o líneas de células adecuadas para la expresión de las proteínas de unión a antígenos de la invención incluyen células de mamífero, tales como NS0, Sp2/0, CHO (por ejemplo, DG44), COS, HEK, una célula de fibroblasto (por ejemplo, 3T3), y células de mieloma, por ejemplo, pueden expresarse en una célula CHO o de mieloma. Pueden emplearse células humanas, permitiendo así que la molécula se modifique con patrones de glicosilación humanos. Como alternativa, pueden emplearse otras líneas de células eucariotas. La selección de las células hospedantes de mamífero adecuadas y los métodos para la transformación, el cultivo, la amplificación, la selección y la producción y purificación del producto son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente.

45 Las células bacterianas pueden demostrar ser útiles como células hospedantes para la expresión de Fab recombinantes u otras realizaciones de la presente invención (véase, por ejemplo, Plükthun, A., Immunol. Rev., 130:151-188 (1992)). Sin embargo, debido a la tendencia de las proteínas expresadas en células bacterianas a estar en una forma desplegada o plegada de modo incorrecto o a estar en una forma no glicosilada, cualquier Fab recombinante producido en una célula bacteriana debe seleccionarse para la conservación de la capacidad de unión al antígeno. Si la molécula expresada por la célula bacteriana se produce en una forma plegada de modo correcto, esta célula bacteriana sería un hospedante deseable o, en realizaciones alternativas, la molécula puede expresarse en el hospedante bacteriano y después volverse a plegar. Por ejemplo, diversas cepas de *E. coli* empleadas para la expresión son muy conocidas como células hospedantes en el campo de la biotecnología. En este método también pueden emplearse diversas cepas de *B. subtilis*, *Streptomyces*, otros bacilos y similares.

55 Cuando se desee, también están disponibles como células hospedantes cepas de células de levadura conocidas por los expertos en la técnica, así como células de insecto, por ejemplo, *Drosophila* y *Lepidoptera* y sistemas de expresión víricos. Véase, por ejemplo, Miller *et al.*, Genetic Engineering, 8:277-298, Plenum Press (1986) y las referencias citadas en este artículo.

Los métodos generales mediante los cuales pueden construirse los vectores, los métodos de transfección requeridos para producir las células hospedantes de la invención, y los métodos de cultivo necesarios para producir los anticuerpos de la invención a partir de dichas células hospedantes pueden ser todas técnicas convencionales.

Generalmente, el método de cultivo de la presente invención es un método de cultivo sin suero, habitualmente mediante el cultivo de células sin suero en suspensión. De modo similar, una vez producidos, los anticuerpos de la invención pueden purificarse de los contenidos del cultivo celular según procedimientos convencionales de la técnica, que incluyen precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares. Estas técnicas están dentro del conocimiento de la técnica y no limitan esta invención. Por ejemplo, se describen preparaciones de anticuerpos alterados en los documentos WO 99/58679 y WO 96/16990.

Otro método de expresión de los anticuerpos de la presente invención puede utilizar la expresión de un animal transgénico, tal como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.873.316. Esta se refiere a un sistema de expresión que emplea el promotor de caseína de animales que, cuando se incorpora transgénicamente a un mamífero, permite a la hembra producir la proteína recombinante deseada en su leche.

En otra realización de la invención se proporciona un método para producir un anticuerpo de la invención, comprendiendo dicho método la etapa de cultivar una célula hospedante transformada o transfectada con un vector que codifica la cadena ligera y/o pesada del anticuerpo de la invención, y recuperar el anticuerpo producido con ello.

Se describe un método para producir un anticuerpo anti-OSM de la presente invención que se une y neutraliza la actividad de la OSM humana, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) proporcionar un primer vector que codifica una cadena pesada del anticuerpo;

(b) proporcionar un segundo vector que codifica una cadena ligera del anticuerpo;

(c) transformar una célula hospedante de mamífero (por ejemplo, CHO) con dicho primer y segundo vector;

(d) cultivar la célula hospedante de la etapa (c) bajo condiciones que conducen a la secreción del anticuerpo desde dicha célula hospedante hacia dicho medio de cultivo;

(e) recuperar el anticuerpo segregado de la etapa (d).

Tras haber sido expresado mediante el método deseado, el anticuerpo después se estudia para la actividad *in vitro* mediante el uso de un ensayo apropiado. En la actualidad se emplean formatos de ensayo ELISA convencionales para evaluar la unión cualitativa y cuantitativa del anticuerpo a la OSM. Además, también pueden emplearse otros ensayos *in vitro* para verificar la eficacia neutralizante antes de posteriores estudios clínicos en seres humanos realizados para evaluar la persistencia del anticuerpo en el cuerpo a pesar de los mecanismos de eliminación habituales.

La dosis y la duración del tratamiento se refieren a la duración relativa de las moléculas de la presente invención en la circulación humana y pueden ser ajustadas por los expertos en la técnica dependiendo del trastorno que se está tratando y de la salud general del paciente. Se contempla que puede ser necesaria una dosificación repetida (por ejemplo, una vez semanal o una vez cada dos semanas) a lo largo de un periodo largo de tiempo (por ejemplo, de cuatro a seis meses) para lograr la máxima eficacia terapéutica.

También se describe una célula hospedante recombinante transformada, transfectada o transducida que comprende al menos un módulo de expresión, por ejemplo, en la que el módulo de expresión comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada de una proteína de unión a antígenos según la invención descrita en la presente, y que comprende además un polinucleótido que codifica una cadena ligera de una proteína de unión a antígenos según la invención descrita en la presente, o en la que existen dos módulos de expresión y el primero codifica la cadena ligera y el segundo codifica la cadena pesada. Por ejemplo, en una realización, el primer módulo de expresión comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada de una proteína de unión a antígenos que comprende una región constante, o un fragmento de unión al antígeno de esta, que está unido a una región constante descrita en la presente, y que comprende además un segundo módulo que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera de una proteína de unión a antígenos que comprende una región constante, o un fragmento de unión al antígeno de esta, que está unido a una región constante proporcionada en la presente, por ejemplo, el primer módulo de expresión comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO:70, o SEQ ID NO:76, y un segundo módulo de expresión comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera seleccionada de SEQ ID NO:72.

Se entenderá que las secuencias descritas en la presente (SEQ ID NO:25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 83) incluyen secuencias que son sustancialmente idénticas, por ejemplo, secuencias que son al menos 90% idénticas, preferiblemente, que son al menos 91%, o al menos 92%, o al menos 93%, o al menos 94%, o al menos 95%, o al menos 96%, o al menos 97%, o al menos 98%, o al menos 99% idénticas a las secuencias descritas en la presente.

Para los ácidos nucleicos, la expresión "identidad sustancial" indica que dos ácidos nucleicos, o las secuencias indicadas de estos, cuando se alinean de modo óptimo y se comparan, son idénticas, con las inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas, en al menos aproximadamente 80% de los nucleótidos, de al menos

aproximadamente 90% a aproximadamente 95%, o de al menos aproximadamente 98% a aproximadamente 99,5% de los nucleótidos. Como alternativa, existe una identidad sustancial cuando los segmentos se hibridan bajo condiciones de hibridación selectivas al complemento de la hebra.

5 Para secuencias de nucleótidos y de aminoácidos, el término "idéntico" indica el grado de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos cuando se alinean de modo óptimo y se comparan con las inserciones o deleciones apropiadas. Como alternativa, existe una identidad sustancial cuando los segmentos de ADN se hibridan bajo condiciones selectivas al complemento de la hebra.

10 En otra realización de la invención se proporciona una célula hospedante transformada de modo estable que comprende un vector que comprende uno o más módulos de expresión que codifican una cadena pesada y/o una cadena ligera del anticuerpo que comprende una región constante, o un fragmento de unión al antígeno de esta, que está unido a una región constante, según se describe en la presente. Por ejemplo, estas células hospedantes pueden comprender un primer vector que codifica la cadena ligera, y un segundo vector que codifica la cadena pesada, por ejemplo, el primer vector codifica una cadena pesada seleccionada de SEQ ID NO:70, o SEQ ID NO:76, y un segundo vector que codifica una cadena ligera, por ejemplo, la cadena ligera de SEQ ID NO:72.

15 En otra realización de la presente invención se proporciona una célula hospedante según la invención descrita en la presente, en la que la célula es eucariota, por ejemplo, en la que la célula es de mamífero. Los ejemplos de dichas líneas celulares incluyen CHO o NS0.

20 También se describe un método para la producción de un anticuerpo que comprende una región constante, o un fragmento de unión al antígeno de esta, que está unido a una región constante según la invención descrita en la presente, comprendiendo dicho método la etapa de cultivar una célula hospedante en un medio de cultivo, por ejemplo, un medio de cultivo sin suero.

Se describe un método en el que dicho anticuerpo después se purifica hasta al menos 95% o más (por ejemplo, 98% o más) con respecto a dicho medio de cultivo sin suero que contiene el anticuerpo.

25 En otra realización se proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de unión a antígenos y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En la presente solicitud se describe un kit de partes que comprende la composición descrita en la presente junto con instrucciones para su uso.

30 El modo de administración del agente terapéutico de la invención puede ser cualquier vía adecuada que transporte el agente hasta el hospedante. Los anticuerpos y las composiciones farmacéuticas de la invención son particularmente útiles para la administración parenteral, es decir, subcutánea (s.c.), intratecal, intraperitoneal, intramuscular (i.m.) o intravenosa (i.v.).

35 Los agentes terapéuticos de la invención pueden prepararse como composiciones farmacéuticas que contienen una cantidad eficaz de los anticuerpos de la invención como ingrediente activo en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El agente profiláctico descrito es una suspensión o disolución acuosa que contiene los anticuerpos en una forma lista para inyección. En una realización, la suspensión o la disolución está tamponada a pH fisiológico. En una realización, las composiciones para la administración parenteral comprenderán una disolución de los anticuerpos de la invención, o un cóctel de estos, disueltos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, el vehículo es un vehículo acuoso. Puede emplearse una diversidad de vehículos acuosos, por ejemplo, disolución salina al 0,9%, glicina al 0,3% y similares. Estas disoluciones pueden esterilizarse y se pueden eliminar las partículas. Estas disoluciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales muy conocidas (por ejemplo, filtración). Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes tamponantes y de ajuste del pH, etc. La concentración de los anticuerpos de la invención en esta formulación farmacéutica puede variar mucho, concretamente desde menos de aproximadamente 0,5%, habitualmente al 1% o al menos a 45 aproximadamente 1% hasta aproximadamente 15 o 20% en peso, y se seleccionará basándose principalmente en los volúmenes de fluidos, las viscosidades, etc., según el modo de administración concreto seleccionado.

50 Así, puede prepararse una composición farmacéutica de la invención para la inyección intramuscular para que contenga aproximadamente 1 ml de agua tamponada estéril, y entre aproximadamente 1 ng a aproximadamente 100 mg, por ejemplo de aproximadamente 50 ng a aproximadamente 30 mg, o de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 25 mg de una proteína de unión a antígenos, por ejemplo, un anticuerpo de la invención. De modo similar, puede prepararse una composición farmacéutica de la invención para la infusión intravenosa para que contenga aproximadamente 250 ml de disolución de Ringer estéril, y de aproximadamente 1 a aproximadamente 30, o de 5 mg a aproximadamente 25 mg de los anticuerpos de la invención por ml de disolución de Ringer. Los métodos reales para preparar composiciones que pueden administrarse por vía parenteral son muy conocidos o 55 serán evidentes para los expertos en la técnica y se describen con más detalle, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Science, 15^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania. Para la preparación de formulaciones de anticuerpos de la invención administrables por vía intravenosa véase Lasmay U. y Parkins D., "The formulation of Biopharmaceutical products", Pharma. Sci. Tech. Today, pp. 129-137, vol. 3 (3 de abril, 2000); Wang,

- W., "Instability, stabilisation and formulation of liquid protein pharmaceuticals", *Int. J. Pharm.*, 185 (1999) 129-188; *Stability of Protein Pharmaceuticals Part A and B*, ed. Ahern T.J., Manning M.C., Nueva York, NY, Plenum Press (1992); Akers, M.J., "Excipient-Drug interactions in Parenteral Formulations", *J. Pharm. Sci.*, 91 (2002), 2283-2300; Imamura, K. *et al.*, "Effects of types of sugar on stabilization of Protein in the dried state", *J. Pharm. Sci.*, 92 (2003), 266-274; Izutsu, Kkojima, S., "Excipient crystallinity and its protein-structure-stabilizing effect during freeze-drying", *J. Pharm. Pharmacol.*, 54 (2002), 1033-1039; Johnson, R., "Mannitol-sucrose mixtures-versatile formulations for protein lyophilization", *J. Pharm. Sci.*, 91 (2002), 914-922; y Ha, E., Wang, W., Wang, Y.j., "Peroxide formation in polysorbate 80 and protein stability", *J. Pharm. Sci.*, 91, 2252-2264 (2002), a cuyo contenido completo se remite al lector.
- 5
- 10 En una realización, el agente terapéutico de la invención, cuando se encuentra en una preparación farmacéutica, está presente en formas de dosis unitarias. La dosis terapéuticamente eficaz apropiada será determinada con facilidad por los expertos en la técnica. Las dosis adecuadas pueden ser calculadas para pacientes según su peso, por ejemplo, las dosis adecuadas pueden estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg/kg, por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg/kg, por ejemplo de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mg/kg, o por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 mg/kg, por ejemplo de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/kg. Para tratar de modo eficaz trastornos, tales como asma o IPF en un ser humano, las dosis adecuadas pueden estar en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 mg, por ejemplo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 mg, por ejemplo aproximadamente 500 mg, por ejemplo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100 mg, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 80 mg, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 60 mg, o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 40 mg, o por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg de un anticuerpo según esta invención, que puede ser administrado por vía parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, intravenosa o intramuscular. Esta dosis puede repetirse, si es necesario, en intervalos de tiempo apropiados seleccionados como apropiados por un médico.
- 15
- 20
- 25 Los anticuerpos descritos en la presente pueden liofilizarse para su conservación y reconstituirse en un vehículo adecuado antes del uso. Esta técnica ha demostrado ser eficaz con inmunoglobulinas convencionales y pueden emplearse técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la técnica.
- En otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para tratar a un paciente humano que padece una artropatía inflamatoria, tal como artritis reumatoide, artritis de aparición en la juventud, osteoartritis, artritis psoriática y espondilitis anquilosante, comprendiendo dicho método la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos, según se describen en la presente.
- 30
- En otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para tratar a un paciente humano que padece una enfermedad o un trastorno seleccionado de diabetes de tipo 1, psoriasis, enfermedad del intestino inflamatoria (IBD), que incluye enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (UC), lupus eritematoso sistémico (SLE, lupus), dermatitis atópica, rinitis alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), neumonía, esofagitis eosinófila, esclerosis sistémica (SS) o fibrosis pulmonar idiopática (IPF), síndrome de Sjögren, escleroderma, vasculitis (que incluyen arteritis de Takayasu, arteritis de células gigantes (temporal), poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Kawasaki, vasculitis del SNC aislada, arteritis de Churg-Strauss, poliangiitis/poliarteritis microscópica, vasculitis de hipersensibilidad (vasculitis alérgica), púrpura de Henoch-Schonlein, y vasculitis crioglobulinémica esencial), espondiloartropatía indiferenciada (USpA), espondilitis anquilosante (AS), enfermedad del receptor frente al injerto (GVHD), cirrosis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PSC), púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), esclerosis múltiple (MS), y asma, en el que dicho método comprende la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos, según se describen en la presente.
- 35
- 40
- 45 Una cualquiera o más de las enfermedades mencionadas anteriormente pueden ser la enfermedad diana para un método de tratamiento de la invención.
- En un aspecto concreto, la enfermedad o el trastorno se selecciona del grupo que consiste en osteoartritis (OA), psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática (IPF), esclerosis sistémica (SS), síndrome de Sjögren, escleroderma, o esclerosis múltiple (MS).
- 50 En un aspecto de la presente invención, la enfermedad autoinmunitaria es la osteoartritis.
- En un aspecto de la presente invención, la enfermedad autoinmunitaria es la psoriasis.
- En un aspecto de la presente invención, la enfermedad o trastorno autoinmunitario es una enfermedad o trastorno fibrótico.
- En un aspecto de la presente invención, la enfermedad autoinmunitaria es la fibrosis pulmonar idiopática (IPF).
- 55 En un aspecto de la presente invención, la enfermedad autoinmunitaria es la esclerosis sistémica (SS).
- En un aspecto de la presente invención, la enfermedad autoinmunitaria es el síndrome de Sjögren.

En un aspecto de la presente invención, la enfermedad autoinmunitaria es la escleroderma.

5 En otro aspecto de la invención se proporciona un método para reducir o prevenir la degradación del cartilago en un paciente humano que padece (o que es susceptible a padecer) dicha degradación, comprendiendo dicho método la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos a dicho paciente, según se describen en la presente.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para reducir la producción de TNF-alfa en un paciente que padece una enfermedad o un trastorno que responde a la reducción del TNF-alfa, comprendiendo dicho método administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos, según se describen en la presente.

10 En otro aspecto de la invención se proporciona un método para tratar las manifestaciones extraarticulares de una enfermedad o un trastorno artrítico, por ejemplo, síndrome de Felty y/o para tratar la formación de placas ateroscleróticas, comprendiendo dicho método la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos, según se describen en la presente, al paciente humano que padece las manifestaciones extraarticulares de una enfermedad o un trastorno artrítico.

15 En otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para tratar un paciente humano que padece una enfermedad de origen en las células endoteliales, comprendiendo dicho método las etapas de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos, según se describen en la presente.

20 En otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para tratar un paciente humano que padece enfermedades o trastornos fibróticos, tales como fibrosis pulmonar idiopática, esclerosis sistémica progresiva (escleroderma), fibrosis hepática, granulomas hepáticos, esquistosomiasis y leishmaniasis, comprendiendo dicho método las etapas de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos, según se describen en la presente.

25 En otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para tratar un paciente humano que padece una enfermedad o un trastorno del sistema nervioso central, tal como esclerosis múltiple (MS), enfermedad de Alzheimer (AD) y otras demencias, y además se refiere al uso en el tratamiento del dolor, en particular del dolor neuropático y/o inflamatorio, en el que dicho método comprende las etapas de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos, según se describen en la presente.

También se proporciona el uso de los anticuerpos, según se describen en la presente, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y trastornos.

30 Por ejemplo, en un aspecto se describe el uso de los anticuerpos, según se describen en la presente, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades y trastornos que responden a la modulación de la interacción entre hOSM y gp130.

35 En otro aspecto de la invención se proporciona el uso de los anticuerpos, según se describen en la presente, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una artropatía inflamatoria, tal como artritis reumatoide, artritis de aparición en la juventud, osteoartritis, artritis psoriática y espondilitis anquilosante.

40 En otro aspecto de la invención se proporciona el uso de los anticuerpos, según se describen en la presente, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o un trastorno seleccionado de diabetes de tipo 1, psoriasis, enfermedad del intestino inflamatoria (IBD), que incluye enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (UC), lupus eritematoso sistémico (SLE, lupus), dermatitis atópica, rinitis alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), neumonía, esofagitis eosinófila, esclerosis sistémica (SS) o fibrosis pulmonar idiopática (IPF), síndrome de Sjögren, escleroderma, vasculitis (que incluyen arteritis de Takayasu, arteritis de células gigantes (temporal), poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Kawasaki, vasculitis del SNC aislada, arteritis de Churg-Strauss, poliangiitis/poliarteritis microscópica, vasculitis de hipersensibilidad (vasculitis alérgica), púrpura de Henoch-Schonlein, y vasculitis crioglobulinémica esencial), espondiloartropatía indiferenciada (USpA), espondilitis anquilosante (AS), enfermedad del receptor frente al injerto (GVHD), cirrosis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PSC), púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), esclerosis múltiple (MS), y asma, en el que dicho método comprende la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos, según se describen en la presente.

50 Por ejemplo, en un aspecto particular se proporciona el uso de los anticuerpos para su uso en el tratamiento o la profilaxis de la osteoartritis (OA), psoriasis, fibrosis pulmonar idiopática (IPF) o esclerosis múltiple (MS).

Otros aspectos y ventajas de la presente invención se describirán a continuación en la descripción detallada y sus realizaciones.

55 En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente invención y vehículo farmacéuticamente aceptable para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades y/o trastornos inflamatorios, por ejemplo, una artropatía inflamatoria, tal como artritis reumatoide, artritis de aparición en la juventud,

5 osteoartritis, artritis psoriática y espondilitis anquilosante, o seleccionados de diabetes de tipo 1, psoriasis, enfermedad del intestino inflamatoria (IBD), que incluye enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (UC), lupus eritematoso sistémico (SLE, lupus), dermatitis atópica, rinitis alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), neumonía, esofagitis eosinófila, esclerosis sistémica (SS) o fibrosis pulmonar idiopática (IPF), síndrome de Sjögren, escleroderma, vasculitis (que incluyen arteritis de Takayasu, arteritis de células gigantes (temporal), poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Kawasaki, vasculitis del SNC aislada, arteritis de Churg-Strauss, poliangiitis/poliarteritis microscópica, vasculitis de hipersensibilidad (vasculitis alérgica), púrpura de Henoch-Schonlein, y vasculitis crioglobulinémica esencial), espondiloartropatía indiferenciada (USpA), espondilitis anquilosante (AS), enfermedad del receptor frente al injerto (GVHD), cirrosis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PSC), púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), esclerosis múltiple (MS), y asma.

15 En otra realización de la presente invención se proporciona un método para tratar un paciente humano que padece una enfermedad o un trastorno inflamatorio, comprendiendo dicho método la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos según la invención, tal como se describe en la invención, por ejemplo, se proporciona un método para tratar un paciente humano que padece una enfermedad o un trastorno inflamatorio, comprendiendo dicho método la etapa de administrar una composición farmacéutica que comprende anticuerpos según la presente invención, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, se proporciona un método para tratar un paciente humano que padece una enfermedad o un trastorno inflamatorio seleccionado, por ejemplo, de una artropatía inflamatoria, tal como artritis reumatoide, artritis de aparición en la juventud, osteoartritis, artritis psoriática y espondilitis anquilosante, o seleccionados de diabetes de tipo 1, psoriasis, enfermedad del intestino inflamatoria (IBD), que incluye enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (UC), lupus eritematoso sistémico (SLE, lupus), dermatitis atópica, rinitis alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), neumonía, esofagitis eosinófila, esclerosis sistémica (SS) o fibrosis pulmonar idiopática (IPF), síndrome de Sjögren, escleroderma, vasculitis (que incluyen arteritis de Takayasu, arteritis de células gigantes (temporal), poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Kawasaki, vasculitis del SNC aislada, arteritis de Churg-Strauss, poliangiitis/poliarteritis microscópica, vasculitis de hipersensibilidad (vasculitis alérgica), púrpura de Henoch-Schonlein, y vasculitis crioglobulinémica esencial), espondiloartropatía indiferenciada (USpA), espondilitis anquilosante (AS), enfermedad del receptor frente al injerto (GVHD), cirrosis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PSC), púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), esclerosis múltiple (MS), y asma.

30 En un aspecto alternativo se describe un método para humanizar un anticuerpo no humano, o uno de sus fragmentos de anticuerpo, comprendiendo dicho métodos las etapas de:

- a) incorporar una o más CDR no humanas a un marco aceptor humano para producir un anticuerpo quimérico o humanizado,
- b) unir el anticuerpo quimérico o humanizado a su antígeno,
- c) determinar los restos del anticuerpo implicados directamente en la unión al antígeno,
- 35 d) mutar uno o más de los restos no implicados en la etapa (c) a una secuencia de línea germinal humana,
- e) recuperar dicho anticuerpo.

40 En otro aspecto, los restos del anticuerpo implicados en la unión al antígeno pueden determinarse mediante cristalografía, formación de modelos de homología, acoplamiento de proteínas, mutagénesis o cartografiado de péptidos lineales. Por ejemplo, en uno de estos aspectos tal como se describen en la presente, se obtiene la estructura cristalográfica del cocristal de anticuerpo-antígeno y se determina que los restos implicados en la unión están entre aproximadamente 2-5 Å.

La expresión no humana incluye cualquier anticuerpo que pueda ser mutado o sustituido de algún modo para que se parezca más a una secuencia de línea germinal humana. De esta manera se disminuye la probabilidad de inmunogenicidad.

45 En aspecto, al menos una CDR se revierte a la línea germinal. En otro aspecto, al menos dos CDR se revierten a la línea germinal. En otro aspecto, al menos 5 restos se revierten a la línea germinal, por ejemplo, al menos 7 o al menos 8 o al menos 9 o al menos 10 restos se revierten a la línea germinal.

50 La transferencia de anticuerpos monoclonales no humanos, o sus fragmentos, a un aceptor humano a menudo se basa además en la introducción de cambios dentro del marco para reestablecer las interacciones de región CDR-antígeno apropiadas y estos a menudo se denominan retromutaciones. En una realización descrita en la presente son necesarias retromutaciones para reestablecer las interacciones de región CDR-antígeno apropiadas.

En una realización alternativa, el marco aceptor humano puede incorporarse a un anticuerpo con una o más CDR no humanas para producir un anticuerpo quimérico. En otra realización alternativa, la secuencia puede generarse mediante oligosíntesis.

55 Las CDR (o restos de la región hipervariable) del anticuerpo no humano se incorporan en VL y/o VH de los marcos

aceptores no humanos. Por ejemplo, se pueden incorporar restos que se corresponden con restos de CDR de Kabat, restos del bucle hipervariable de Chothia, los restos Abm y/o restos de contacto.

En una realización se describe un método para humanizar un anticuerpo, comprendiendo dicho métodos las etapas de:

- 5 a) obtener un anticuerpo no humano que se une a un antígeno diana,
- b) obtener la estructura cristalográfica del cocrystal de anticuerpo-antígeno,
- c) determinar, hasta aproximadamente 2-5 Å de la estructura cristalina, los restos del anticuerpo no humano implicados directamente en la unión al antígeno,
- e) mutar uno o más de los restos no implicados en la c) a un resto derivado de una secuencia humana,
- 10 f) recuperar dicho anticuerpo.

En otra realización de los métodos descritos en la presente, el anticuerpo o el fragmento de unión del anticuerpo conserva la unión a su antígeno. Por ejemplo, el anticuerpo o el fragmento de unión del anticuerpo conserva la unión a su antígeno comparado con el anticuerpo no humano. Por ejemplo, el anticuerpo de la etapa f) tiene una afinidad de unión (KD) dentro de 10 veces más o mayor del anticuerpo no humano de la etapa a), por ejemplo, el anticuerpo de la etapa f) tiene una afinidad de unión (KD) dentro de 3-5 veces más o mayor del anticuerpo no humano de la etapa a).

Por ejemplo, el anticuerpo o el fragmento de unión del anticuerpo conserva la unión a su antígeno dentro de 100 nM del anticuerpo no humano cuando se mide mediante Biacore, o dentro de 100 nM del anticuerpo no humano cuando se mide mediante Biacore. Por ejemplo, el anticuerpo o el fragmento de unión del anticuerpo conserva la unión a su antígeno dentro de 500 pM del anticuerpo no humano cuando se mide mediante Biacore, o dentro de 300 pM del anticuerpo no humano cuando se mide mediante Biacore. Por ejemplo, el anticuerpo de la etapa f) se une a su antígeno con una afinidad (KD) que es igual o menor que 400 pM, o igual o menor que 300 pM, o es igual o menor que 200 pM, o es igual o menor que 140 pM.

25 En otra realización de los métodos descritos en la presente, el anticuerpo o el fragmento de unión del anticuerpo conserva las mismas estructuras canónicas que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo no humano.

En otra realización, el anticuerpo no humano, o uno de sus fragmentos de anticuerpo, procede de un animal no humano, por ejemplo, ratón, rata, conejo, camélido o tiburón.

En otra realización, el anticuerpo no humano, o uno de sus fragmentos de anticuerpo, procede de un ratón.

30 En otra realización, el anticuerpo no humano, o uno de sus fragmentos de anticuerpo, es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal o un anticuerpo multiespecífico, o puede ser un dominio variable único de una inmunoglobulina, por ejemplo, un dominio variable único de una inmunoglobulina de camélido o tiburón, o puede ser un dominio que se deriva de un andamiaje de proteína que no procede de un anticuerpo ni es humana.

En otra realización, el anticuerpo no humano es un anticuerpo monoclonal.

35 En una realización de los métodos descritos en la presente, al menos 2 CDR no humanas se incorporan en la secuencia aceptora humana, o al menos 3 CDR o al menos 4 CDR o al menos 5 o las 6 CDR se incorporan en la secuencia aceptora humana.

40 En otra realización de los métodos descritos en la presente, los restos que se van a mutar a un resto derivado de una secuencia humana que no están implicados directamente en la unión al antígeno y que no son ya humanos pueden ser restos en las CDR o en las regiones de marco o en ambos. En otra realización, al menos 1 CDR es mutada a una secuencia de línea germinal humana, o al menos 2 CDR son mutadas, o al menos 3 CDR son mutadas, o al menos 4 CDR son mutadas.

45 En otra realización, al menos 5 restos son mutados a una secuencia de línea germinal humana, o al menos 7 restos, o al menos 10 restos, o al menos 15 restos, o al menos 20 restos, o al menos 40 restos, o al menos 60 restos son mutados a la secuencia de línea germinal humana.

En otra realización de los métodos descritos en la presente, los restos del anticuerpo implicados directamente con la unión al antígeno se determinan hasta aproximadamente 2-5 Å, o hasta aproximadamente 3-5 Å, o hasta aproximadamente 3-4 Å, o hasta aproximadamente 3,5 Å.

50 En otra realización de los métodos descritos en la presente, se proporciona un anticuerpo que puede obtenerse mediante dicho método.

Definiciones

La expresión "proteína de unión a antígenos", tal como se emplea en la presente, se refiere a anticuerpos, fragmentos de anticuerpo y otras construcciones de proteínas que son capaces de unirse y neutralizar la OSM humana.

- 5 Los términos Fv, Fc, Fd, Fab, o F(ab)₂ se emplean con sus significados habituales (véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)).

El término "anticuerpo" se emplea en la presente en su sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos).

- 10 El término "anticuerpo monoclonal", tal como se emplea en la presente, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que puedan estar presentes en cantidades muy pequeñas. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un único sitio de unión antigénico. Además, por contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que generalmente
15 incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epitopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante sobre el antígeno.

- Un "anticuerpo quimérico" se refiere a un tipo de anticuerpo modificado en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondiente secuencias en anticuerpos derivados de una clase o subclase concreta de anticuerpo donante, mientras que el resto de la cadena o cadenas son idénticas u homólogas
20 a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, con la condición de que muestren la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4.816.567, y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855, 1984).

- Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un tipo de anticuerpo modificado cuyas CDR se derivan de una inmunoglobulina donante no humana y el resto de las partes de la molécula derivadas de inmunoglobulinas proceden de una o más inmunoglobulinas humanas. Además, los restos soporte del marco pueden alterarse para conservar la afinidad de unión (véase, por ejemplo, Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:10029-10032, 1989; Hodgson *et al.*, *Bio/Technology*, 9:421, 1991). Un anticuerpo aceptor humano adecuado puede seleccionarse de una base de datos convencional, por ejemplo, la base de datos KABAT®, la base de datos de Los Alamos y la base de datos Swiss Protein, mediante homología con las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos del anticuerpo donante. Un anticuerpo humano caracterizado por tener homología con las regiones de marco del anticuerpo donante (sobre la base de los aminoácidos) puede ser adecuado para proporcionar una región constante de cadena pesada y/o una región de marco variable de cadena pesada para la inserción de CDR donantes. Puede seleccionarse un anticuerpo aceptor capaz de donar regiones de marco variables o constantes de cadena ligera de una manera similar. Debe advertirse que no es necesario que las cadenas pesada y ligera del anticuerpo aceptor se originen del mismo anticuerpo aceptor. La técnica anterior describe varias formas de producir dichos anticuerpos humanizados; véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-0239400 y EP-A-054951.

"Identidad" significa, para polinucleótidos y polipéptidos, según sea el caso, la comparación calculada empleando un algoritmo proporcionado en los siguientes (1) y (2):

- 40 (1) La identidad para los polinucleótidos se calcula multiplicando el número total de nucleótidos en una secuencia concreta por el número entero que define el porcentaje de identidad dividido entre 100 y después restando ese producto de dicho número total de nucleótidos en dicha secuencia, o:

$$nn \leq xn - (xn \bullet y),$$

- 45 en la que nn es el número de alteraciones de nucleótidos, xn es el número total de nucleótidos en una secuencia concreta, y es 0,95 para 95%, 0,97 para 97% o 1,00 para 100%, y \bullet es el símbolo del operador de la multiplicación, y en la que cualquier producto de xn e y que no sea un número entero se redondea hacia abajo hasta el número entero más cercano antes de restarlo de xn. Las alteraciones de una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido pueden crear mutaciones sin sentido, de sentido erróneo o de desplazamiento de marco en esa secuencia codificadora y, con ello, alterar el polipéptido codificado por el polinucleótido después de dichas alteraciones.

(2) La identidad para los polipéptidos se calcula multiplicando el número total de aminoácidos por el número entero que define el porcentaje de identidad dividido entre 100 y después restando ese producto del dicho número total de aminoácidos, o:

$$na \leq xa - (xa \bullet y),$$

- 55 en la que na es el número de alteraciones de aminoácidos, xa es el número total de aminoácidos en la secuencia, y

es 0,95 para 95%, 0,97 para 97% o 1,00 para 100%, y \bullet es el símbolo del operador de la multiplicación, y en la que cualquier producto de x a e y que no sea un número entero se redondea hacia abajo hasta el número entero más cercano antes de restarlo de x .

5 "Aislado" significa alterado "por la mano humana" de su estado natural, que ha sido cambiado o retirado de su entorno original, o ambos. Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido que está presente de modo natural en un organismo vivo no está "aislado", pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales coexistentes en su estado natural está "aislado", que incluye, pero no se limita al caso en que dicho polinucleótido o polipéptido se vuelve a introducir en una célula, incluso si la célula pertenece a la misma especie o tipo de la cual el polinucleótido o el polipéptido ha sido separado.

10 A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, los términos "comprende" y "comprendiendo" incorpora "consiste en" y "consistiendo en". Es decir, estos términos pretenden transmitir la posible inclusión de otros elementos o números enteros que no se mencionan específicamente, cuando el contexto lo permita.

15 La expresión "se une específicamente", tal como se emplea a lo largo de la presente memoria descriptiva con relación a los anticuerpos de la invención, significa que los anticuerpos se unen a la OSM humana (hOSM) sin que se unan a otras proteínas humanas o se unen a estas en una cantidad insignificante. Sin embargo, la expresión no excluye el hecho de que los anticuerpos de la invención también pueden presentar reactividad cruzada con otras formas de OSM, por ejemplo, OSM de primate.

20 La expresión "interacciona directamente", tal como se emplea a lo largo de la presente memoria descriptiva con relación a los anticuerpos de la invención, significa que cuando la proteína de unión a antígenos se une a la OSM humana (hOSM), esos restos específicos sobre la proteína de unión a antígenos están dentro de 3,5 Å de restos específicos en la hOSM.

25 El término inhibe, tal como se emplea a lo largo de la presente memoria descriptiva con relación a los anticuerpos de la invención, significa que la actividad biológica de OSM se reduce en presencia de los anticuerpos de la presente invención en comparación con la actividad de OSM en ausencia de dichos anticuerpos. La inhibición puede ser debida, aunque no se limita a uno o más de bloquear la unión del ligando, evitar la activación del receptor por el ligando, infrarregular la OSM o afectar a la funcionalidad efectora. Los anticuerpos de la invención pueden neutralizar la OSM. Los niveles de neutralización pueden medirse de varias formas, por ejemplo, mediante el uso de los ensayos indicados en los siguientes ejemplos, por ejemplo, en 2.2.1 en un ensayo de neutralización de células KB. La OSM es capaz de inducir la liberación de interleuquina 6 de las células KB a través de la señalización por el complejo de Gp130/OSMR. En este ensayo, la neutralización de la OSM se mide evaluando la capacidad de anticuerpos monoclonales anti-OSM para inhibir la producción de IL-6.

30 Si un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de este, es capaz de provocar la neutralización, entonces esto es indicativo de la inhibición de la interacción entre la OSM humana y su receptor gp130. Los anticuerpos que se considera que tienen actividad neutralizante frente a la OSM humana tendrían una CI_{50} menor que 10 microgramos/ml, o menor que 5 microgramos/ml, o menor que 2 microgramos/ml, o menor que 1 microgramo/ml, o menor que 0,1 microgramos/ml en el ensayo de neutralización de células KB según se indica en el ejemplo 2.2.1

35 Las "CDR" se definen como secuencias de aminoácidos de la región determinante de la complementariedad de un anticuerpo que son los dominios hipervariables de las cadenas pesada y ligera de una inmunoglobulina. Hay tres CDR (o CDR regiones) de cadena pesada y tres de cadena ligera en la porción variable de una inmunoglobulina. Por tanto, las "CDR", tal como se emplean en la presente, pueden referirse a las tres CDR de cadena pesada, o las tres CDR de cadena ligera (o ambas CDR de cadena pesada y de cadena ligera, si resulta apropiado).

40 Las CDR proporcionan la mayoría de los restos de contacto para la unión del anticuerpo al antígeno o epitopo. Las CDR de interés en esta invención se derivan de secuencias de cadena pesada y cadena ligera variables del anticuerpo donante e incluyen análogos de las CDR naturales, en los que los análogos también comparten o conservan la misma especificidad de unión al antígeno y/o capacidad neutralizante que el anticuerpo donante del cual se derivan.

45 Las secuencias de CDR de los anticuerpos pueden determinarse mediante el sistema de numeración de Kabat (Kabat *et al.*, Sequences of proteins of Immunological Interest, NIH, 1987) o, como alternativa, pueden determinarse empleando el sistema de numeración de Chothia (Al-Lazikani *et al.* (1997), JMB, 273, 927-948), el método de definición de contacto (MacCallum R.M., Martin A.C.R. y Thornton J.M. (1996), Journal of Molecular Biology, 262 (5), 732-745) o cualquier otro método establecido para numerar los restos en un anticuerpo y para determinar las CDR conocido por los expertos en la técnica.

50 Otras convenciones de numeración para las secuencias de CDR disponibles para los expertos en la técnica incluyen los métodos "AbM" (University of Bath) y "de contacto" (University College London). Puede determinarse la región solapante mínima empleando al menos dos de los métodos de Kabat, Chothia, AbM y de contacto para proporcionar una "unidad mínima de unión". La unidad mínima de unión puede ser una subporción de una CDR.

La siguiente tabla 1 representa una definición empleando cada convención de numeración para cada CDR o unidad de unión. En la tabla 1 se emplea el esquema de numeración de Kabat para numerar la secuencia de aminoácidos del dominio variable. Debe advertirse que algunas de las definiciones de CDR pueden variar dependiendo de la publicación individual usada.

	CDR de Kabat	CDR de Chothia	CDR de AbM	CDR por contacto	Unidad mínima de unión
H1	31-35/35A/35B	26-32/33/34	26-35/35A/35B	30-35/35A/35B	31-32
H2	50-65	52-56	50-58	47-58	52-56
H3	95-102	95-102	95-102	93-101	95-101
L1	24-34	24-34	24-34	30-36	30-34
L2	50-56	50-56	50-56	46-55	50-55
L3	89-97	89-97	89-97	89-96	89-96

5

A lo largo de esta memoria descriptiva, los restos aminoácidos en las secuencias de anticuerpos se numeran según el esquema de Kabat. De modo similar, los términos "CDR", "CDRL1", "CDRL2", "CDRL3", "CDRH1", "CDRH2", "CDRH3" siguen el sistema de numeración de Kabat, según se indica en Kabat *et al.*, Sequences of proteins of Immunological Interest, NIH, 1987.

10 Los términos "VH" y "VL" se emplean en la presente para remitir al dominio variable de cadena pesada y el dominio variable de cadena ligera, respectivamente, de un anticuerpo.

Tal como se emplea en la presente, el término "dominio" se refiere a una estructura de proteína plegada que tiene una estructura terciaria independiente del resto de la proteína. En general, los dominios son responsables de las propiedades funcionales discretas de las proteínas, y en muchos casos pueden añadirse, retirarse o trasladarse a otras proteínas sin pérdida de función del resto de la proteína y/o del dominio. Un "dominio variable único de anticuerpo" es un dominio polipeptídico plegado que comprende secuencias características de dominios variables de anticuerpos. Por tanto, incluye dominios variables y dominios variables modificados de anticuerpos completos, por ejemplo, en los que uno o más bucles han sido reemplazados por secuencias que no son características de dominios variables de anticuerpo, o dominios variables de anticuerpo que han sido truncados o que comprenden extensiones N- o C-terminales, así como fragmentos plegados de dominios variables que conservan al menos la actividad de unión y la especificidad del dominio de longitud completa.

La expresión "dominio variable único de inmunoglobulina" se refiere a un dominio variable de anticuerpo (VH, VHH, VL) que se une específicamente a un antígeno o epitopo independientemente de un dominio o región V diferente. Un dominio variable único de inmunoglobulina puede estar presente en un formato (por ejemplo, homo- o heteromultímero) con otro u otros dominios variables o regiones variables diferentes, en el que las otras regiones o dominios no son necesarios para la unión al antígeno del dominio variable único de inmunoglobulina (es decir, el dominio variable único de inmunoglobulina se une al antígeno independientemente de los dominios variables adicionales). Un "anticuerpo de dominio" o "dAb" es igual a un "dominio variable único de inmunoglobulina" que es capaz de unirse a un antígeno, tal como se emplea el término en la presente. Un dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un dominio variable de anticuerpo humano, pero también incluye dominios variables únicos de anticuerpos procedentes de otras especies, tales como dAb de VHH de roedores (por ejemplo, tal como se describe en el documento WO 00/29004), de camélido y de tiburón nodriza. Las VHH de camélido son polipéptidos de dominio variable único de inmunoglobulina que se derivan de especies que incluyen el camello, la llama, la alpaca, el dromedario y el guanaco, que producen anticuerpos de cadena pesada naturalmente exentos de cadenas ligeras. Estos dominios VHH pueden humanizarse según técnicas convencionales disponibles en la técnica, y esos dominios siguen considerándose "anticuerpos de dominio" según la invención. Tal como se emplea en la presente, "VH" incluye dominios VHH. Los NARV son otro tipo de dominio variable único de inmunoglobulina que se identificaron en peces cartilaginosos, que incluyen el tiburón nodriza. Estos dominios también se denominan región variable del receptor de antígeno nuevo (abreviado como V(NAR) o NARV). Para más detalles, véase Mol. Immunol., 44, 656-665 (2006), y el documento US20050043519A.

La expresión "dominio de unión al epitopo" se refiere a un dominio que se une específicamente a un antígeno o epitopo independientemente de una región o dominio V diferente, y puede ser un anticuerpo de dominio (dAb), por ejemplo, un dominio variable único de inmunoglobulina humano, de camélido o de tiburón, o puede ser un dominio que se deriva de un andamiaje seleccionado del grupo que consiste en CTLA-4 (evicuerpo); lipocalina; moléculas derivadas de proteína A, tales como el dominio Z de proteína A (aficuerpo, SpA), dominio A (avímero/maxicuerpo); proteínas de choque térmico, tales como GroEI y GroES; transferrina (transcuerpo); proteína de repetición de anquirina (DARPin); aptámero de péptido; dominio de lectina de tipo C (tetranectina); γ -cristalina humana y ubiquitina humana (afilinas); dominios PDZ; dominios de tipo Kunitz de toxina de escorpión de inhibidores de

45

proteasa humana; y fibronectina (adnectina), que se han sometido a modificación de la proteína para obtener la unión a un ligando distinto al ligando natural.

- 5 CTLA-4 (antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos) es un receptor de la familia de CD28 expresado principalmente sobre células T CD4+. Su dominio extracelular tiene un plegamiento de Ig similar al dominio variable. Los bucles correspondientes a las CDR de los anticuerpos pueden sustituirse por una secuencia heteróloga para conferir propiedades de unión diferentes. Las moléculas de CTLA-4 que han sido modificadas para presentar diferentes especificidades de unión también se conocen como evicuerpos. Para más detalles, véase *Journal of Immunological Methods*, 248 (1-2), 31-45 (2001).
- 10 Las lipocalinas son una familia de proteínas extracelulares que transportan moléculas hidrófobas pequeñas, tales como esteroides, bilinas, retinoides y lípidos. Poseen una estructura secundaria de lámina β rígida con una serie de bucles en el extremo abierto de la estructura cónica que pueden modificarse para que se unan a antígenos diana diferentes. Las anticalinas tienen un tamaño de entre 160-180 aminoácidos y se derivan de las lipocalinas. Para más detalles, véase *Biochim. Biophys. Acta*, 1482: 337-350 (2000), documento US7250297B1 y documento US20070224633
- 15 Un aficuerpo es un andamiaje derivado de la proteína A de *Staphylococcus aureus* que puede modificarse para que se una al antígeno. El dominio consiste en un haz de tres hélices de aproximadamente 58 aminoácidos. Se han generado bancos mediante aleatorización de restos superficiales. Para más detalles, véase *Protein Eng. Des. Sel.*, 17, 455-462 (2004), y el documento EP1641818A1.
- 20 Los avimeros son proteínas de multidominio derivadas de la familia de andamiajes de dominios A. Los dominios nativos de aproximadamente 35 aminoácidos adoptan una estructura unida por enlaces disulfuro definida. La diversidad se genera reordenando la variación natural mostrada por la familia de dominios A. Para más detalles, véase *Nature Biotechnology*, 23(12), 1556-1561 (2005), y *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 16(6), 909-917 (junio de 2007).
- 25 Una transferrina es una glicoproteína de transporte sérica monomérica. Las transferrinas pueden modificarse para que se unan a antígenos diana diferentes mediante la inserción de secuencias peptídicas en un bucle superficial permisivo. Los ejemplos de andamiajes de transferrina modificados incluyen los transcuerpos. Para más detalles, véase *J. Biol. Chem.*, 274, 24066-24073 (1999).
- 30 Las proteínas de repetición de anquirina diseñadas ("Designed Ankyrin Repeat Proteins", DARPIn) se derivan de la anquirina, que es una familia de proteínas que median en la unión de proteínas de la membrana integrales al citoesqueleto. Un única repetición de anquirina es un motivo de 33 restos que consiste en dos α -hélices y una vuelta β . Pueden modificarse para que se unan a antígenos diana diferentes mediante la aleatorización de restos en la primera α -hélice y una vuelta β de cada repetición. Puede aumentarse su interfase de unión aumentando el número de módulos (un método de maduración por afinidad). Para más detalles, véase *J. Mol. Biol.*, 332, 489-503 (2003); *PNAS*, 100(4), 1700-1705 (2003); y *J. Mol. Biol.*, 369, 1015-1028 (2007); y el documento S20040132028A1.
- 35 La fibronectina es un andamiaje que puede modificarse para que se una a un antígeno. Las adnectinas consisten en un esqueleto de la secuencia de aminoácidos natural del 10º dominio de las 15 unidades repetidas de la fibronectina humana de tipo III (FN3). Pueden modificarse tres bucles en un extremo del "sándwich" β para permitir que la adnectina reconozca específicamente una diana terapéutica de interés. Para más detalles, véase *Protein Eng. Des. Sel.*, 18, 435-444 (2005), el documento US20080139791, el documento WO2005056764 y el documento US6818418B1.
- 40 Los aptámeros de péptidos son moléculas de reconocimiento combinatorio que consisten en una proteína de andamiaje constante, generalmente tiorredoxina (TrxA), que contiene un bucle de péptido variable constreñido insertado en el sitio activo. Para más detalles, véase *Expert Opin. Biol. Ther.*, 5, 783-797 (2005).
- 45 Los microcuerpos se derivan de microproteínas naturales con una longitud de 25-50 aminoácidos que contienen 3-4 puentes de cisteína. Los ejemplos de microproteínas incluyen KalataB1, conotoxina y knottinas. Las microproteínas tienen un bucle que puede modificarse para que incluya hasta 25 aminoácidos sin afectar al plegamiento global de la microproteína. Para más detalles de los dominios de knottina modificados, véase el documento WO2008098796.
- 50 Otros dominios de unión a epitopos incluyen proteínas que se han empleado como andamiaje para obtener diferentes propiedades de unión al antígeno diana, incluyendo γ -cristalina humana y ubiquitina humana (afilinas), dominios de tipo Kunitz de inhibidores de proteasa humana, dominios PDZ de la proteína de unión a Ras AF-6, toxinas de escorpión (caribdotoxina), dominio de lectina de tipo C (tetranequinas) analizadas en el capítulo 7 - Non-Antibody Scaffolds, de *Handbook of Therapeutic Antibodies* (2007, editado por Stefan Dubel), y *Protein Science*, 15:14-27 (2006). Los dominios de unión a epitopos de la presente invención pueden derivarse de cualquiera de estos dominios de proteína alternativos.
- 55 Tal como se emplea en la presente, la expresión "sitio de unión al antígeno" se refiere a un sitio sobre una proteína que es capaz de unirse específicamente al antígeno, y puede ser un dominio único, por ejemplo, un dominio de unión al epitopo, o pueden ser dominios VH/VL apareados, tal como se encuentran en un anticuerpo convencional.

En algunas realizaciones de la invención, los dominios Fv monocatenarios (ScFv) pueden proporcionar sitios de unión al antígeno.

Los términos "mAbAb" y "dAbmAb" se emplean en la presente para referirse a proteínas de unión a antígenos, según se describe en la memoria descriptiva. Estos dos términos se pueden emplear de modo intercambiable y pretenden tener el mismo significado empleado en la presente.

La expresión "proteína de unión a antígenos", tal como se emplea en la presente, se refiere a anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo de dominio (dAb), ScFv, FAb, FAb2, y otras construcciones de proteínas. Las moléculas de unión a antígenos pueden comprender al menos un dominio variable de Ig, por ejemplo, anticuerpos, anticuerpos de dominio (dAb), Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, ScFv, diacuerpos, mAbAb, aficuerpos, anticuerpos heteroconjugados o anticuerpos biespecíficos. En una realización, la molécula de unión a antígenos es un anticuerpo. En otra realización, la molécula de unión a antígenos es un dAb, es decir, un dominio variable único de inmunoglobulina, tal como un VH, VHH o VL que se une específicamente a un antígeno o epitopo independientemente de un dominio o región V diferente. Las moléculas de unión a antígenos pueden ser capaces de unirse a dos dianas, es decir, pueden ser proteínas de diana dual. Las moléculas de unión a antígenos pueden ser una combinación de anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos, tales como, por ejemplo, uno o más anticuerpos de dominio y/o uno o más ScFv unidos a un anticuerpo monoclonal. Las moléculas de unión a antígenos también pueden comprender un dominio que no es de Ig, por ejemplo, un dominio que se deriva de un andamiaje seleccionado del grupo que consiste en CTLA-4 (evicuerpo); lipocalina; moléculas derivadas de proteína A, tales como el dominio Z de proteína A (aficuerpo, SpA), dominio A (avímero/maxicuerpo); proteínas de choque térmico, tales como GroEl y GroES; transferrina (transcuerpo); proteína de repetición de anquirina (DARPin); aptámero de péptido; dominio de lectina de tipo C (tetranectina); γ -cristalina humana y ubiquitina humana (afilinas); dominios PDZ; dominios de tipo Kunitz de toxina de escorpión de inhibidores de proteasa humana; y fibronectina (adnectina), que se han sometido a modificación de la proteína para obtener la unión a OSM. Tal como se emplea en la presente, una "proteína de unión a antígenos" será capaz de antagonizar y/o neutralizar la OSM humana. Además, una proteína de unión a antígenos puede inhibir y/o bloquear la actividad de OSM uniéndose a la OSM y evitando que un ligando natural se una y/o activando el receptor gp130.

La expresión "función efectora", tal como se emplea en la presente, se refiere a uno o más de una actividad citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), respuestas mediadas por una actividad citotóxica dependiente del complemento (CDC), fagocitosis mediada por Fc y reciclaje de anticuerpos a través del receptor de FcRn. Para los anticuerpos IgG, las funcionalidades efectoras, que incluyen ADCC y ADCP, son mediadas por la interacción de la región constante de cadena pesada con una familia de receptores de Fc γ presentes sobre la superficie de las células inmunológicas. En los seres humanos, estos incluyen Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16). La interacción entre la proteína de unión a antígenos unida al antígeno y la formación del complejo de Fc/Fc γ induce una gama de efectos que incluyen citotoxicidad, activación de células inmunológicas, fagocitosis y liberación de citoquinas inflamatorias.

Se cree que la interacción entre la región constante de una proteína de unión a antígenos y diversos receptores de Fc (FcR) media en las funciones efectoras de la proteína de unión a antígenos. La funcionalidad efectora puede producir unos efectos biológicos significativos, en particular, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fijación del complemento (citotoxicidad dependiente del complemento o CDC), y semivida/eliminación de la proteína de unión a antígenos. Habitualmente, la capacidad para mediar en la función efectora requiere la unión de la proteína de unión a antígenos a un antígeno, y no todas las proteínas de unión a antígenos median en cada función efectora.

La función efectora puede medirse de una serie de formas que incluyen, por ejemplo, a través de la unión del Fc γ RIII a células asesinas naturales o a través de la unión de Fc γ RI a monocitos/macrófagos para medir la función efectora de ADCC. Por ejemplo, una proteína de unión a antígenos, tal como se describe en la presente, puede evaluarse para la función efectora de ADCC en un ensayo de células asesinas naturales. Pueden encontrarse ejemplos de dichos ensayos en Shields *et al.*, 2001, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, pp. 6591-6604; Chappel *et al.*, 1993, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, pp. 25124-25131; Lazar *et al.*, 2006, *PNAS*, 103, 4005-4010. Los ejemplos de ensayos para determinar la función de CDC incluyen los descritos en 1995, *J. Imm. Meth.*, 184:29-38.

Algunos isotipos de regiones constantes humanas, en particular los isotipos IgG4 e IgG2, carecen fundamentalmente de las funciones de a) activación del complemento por medio de la vía clásica; y b) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Pueden realizarse diversas modificaciones de la región constante de cadena pesada de las proteínas de unión a antígenos dependiendo de la propiedad efectora deseada. Se ha indicado, en diferentes publicaciones, que las regiones constantes de IgG1 que contienen mutaciones específicas reducen la unión a los receptores de Fc y, por tanto, reducen ADCC y CDC (Duncan *et al.*, *Nature*, 1988, 332, 563-564; Lund *et al.*, *J. Immunol.*, 1991, 147, 2657-2662; Chappel *et al.*, *PNAS*, 1991, 88, 9036-9040; Burton y Woof, *Adv. Immunol.*, 1992, 51, 1-84; Morgan *et al.*, *Immunology*, 1995, 86, 319-324; Hezareh *et al.*, *J. Virol.*, 2001, 75 (24), 12161-12168).

Una realización, tal como se describe en la presente, es una proteína de unión a antígenos que comprende una región constante, de tal forma que la proteína de unión a antígenos tiene una ADCC y/o activación del complemento

o funcionalidad efectora reducidas. En esta realización, la región constante de cadena pesada puede comprender una región constante naturalmente inutilizada del isotipo IgG2 o IgG4 o una región constante de IgG1 mutada. Se describen ejemplos de modificaciones adecuadas en el documento EP0307434. Un ejemplo comprende sustituciones de restos alanina en las posiciones 235 y 237 (numeración según el índice de la UE).

- 5 También se ha indicado que las regiones constantes de IgG1 humana que contienen mutaciones específicas o una glicosilación alterada en el resto Asn297 potencian la unión a los receptores de Fc. En algunos casos, estas mutaciones también han demostrado potenciar ADCC y CDC (Lazar *et al.*, PNAS, 2006, 103, 4005-4010; Shields *et al.*, J. Biol. Chem., 2001, 276, 6591-6604; Nechansky *et al.*, Mol. Immunol., 2007, 44, 1815-1817).

10 En una realización, tal como se describe en la presente, dichas mutaciones se producen en una o más posiciones seleccionadas de 239, 332 y 330 (IgG1), o las posiciones equivalentes en otros isotipos de IgG. Los ejemplos de mutaciones adecuadas son S239D e I332E y A330L. En una realización, la proteína de unión a antígenos descrita en la presente está mutada en las posiciones 239 y 332, por ejemplo, S239D e I332E o, en otra realización, está mutada en tres o más posiciones seleccionadas de 239 y 332 y 330, por ejemplo, S239D e I332E y A330L (numeración según el índice de la UE).

15 En una realización alternativa, se describe una proteína de unión a antígenos que comprende una región constante de cadena pesada con un perfil de glicosilación alterado, de modo que la proteína de unión a antígenos presenta una función efectora potenciada, por ejemplo, en la que la proteína de unión a antígenos presenta una ADCC potenciada o una CDC potenciada, o en la que presenta ambas funciones efectoras ADCC y CDC potenciadas. Los ejemplos de metodologías adecuadas para producir proteínas de unión a antígenos con un perfil de glicosilación alterado se describen en los documentos WO2003011878, WO2006014679 y EP1229125, todos los cuales pueden aplicarse a las proteínas de unión a antígenos descritas.

20 La presente solicitud también describe un método para la producción de una proteína de unión a antígenos que comprende las etapas de:

25 a) cultivar una célula hospedante recombinante que comprende un vector de expresión que comprende el ácido nucleico aislado, según se describe en la presente, en el que el gen FUT8 que codifica la alfa-1,6-fucosiltransferasa ha sido inactivado en la célula hospedante recombinante; y

b) recuperar la proteína de unión a antígenos.

30 Estos métodos para la producción de proteínas de unión a antígenos pueden realizarse, por ejemplo, empleando el sistema tecnológico POTELLIGENT™, disponible en BioWa, Inc. (Princeton, NJ), en el que células CHOK1SV que carecen de una copia funcional del gen FUT8 producen anticuerpos monoclonales que presentan una actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) potenciada que es mayor con relación a un anticuerpo monoclonal idéntico producido en una célula con un gen FUT8 funcional. Los aspectos del sistema tecnológico POTELLIGENT™ se describen en los documentos US7214775, US6946292, WO0061739 y WO0231240. Los expertos en la técnica también reconocerán otros sistemas apropiados.

35 En una realización, se describe una proteína de unión a antígenos que comprende una región constante de cadena pesada quimérica, por ejemplo, una proteína de unión a antígenos que comprende una región constante de cadena pesada quimérica con al menos un dominio CH2 procedente de IgG3, de modo que la proteína de unión a antígenos tiene una función efectora potenciada, por ejemplo, en la que tiene funciones ADCC potenciadas o CDC potenciadas, o ADCC y CDC potenciadas. En una de estas realizaciones, la proteína de unión a antígenos puede comprender un dominio CH2 procedente de IgG3, o ambos dominios CH2 pueden proceder de IgG3.

40 También se describe un método para producir una proteína de unión a antígenos que comprende las etapas de:

a) cultivar una célula hospedante recombinante que comprende un vector de expresión que comprende un ácido nucleico aislado, según se describe en la presente, en el que el vector de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio Fc que presenta restos aminoácidos de dominios Fc de IgG1 e IgG3; y

45 b) recuperar la proteína de unión a antígenos.

50 Estos métodos para la producción de proteínas de unión a antígenos pueden realizarse, por ejemplo, empleando el sistema tecnológico COMPLEGENT™, disponible en BioWa, Inc. (Princeton, NJ) y Kyowa Hakko Kogyo (ahora Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.) Co., Ltd., en el que una célula hospedante recombinante que comprende un vector de expresión en el que una secuencia de ácido nucleico que codifica un dominio Fc quimérico que contiene restos aminoácidos del dominio Fc de IgG1 e IgG3 se expresa para producir una proteína de unión a antígenos que tiene una actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) potenciada que es mayor con relación a una proteína de unión a antígenos por lo demás idéntica que carece de dicho dominio Fc quimérico. Los aspectos del sistema tecnológico COMPLEGENT™ se describen en los documentos WO2007011041 y US20070148165. En una realización alternativa, la actividad CDC puede aumentar introduciendo mutaciones específicas de secuencia en la

55 región Fc de una cadena de IgG. Los expertos en la técnica también reconocerán otros sistemas apropiados.

Será evidente para los expertos en la técnica que dichas modificaciones no solo pueden emplearse por sí solas, sino que también pueden usarse en combinación entre sí para potenciar aún más la función efectora. En la presente solicitud se describe una proteína de unión a antígenos que comprende una región constante de cadena pesada que comprende una región constante de cadena pesada mutada y quimérica, por ejemplo, en la que una proteína de unión a antígenos comprende al menos un dominio CH2 procedente de IgG3 y un dominio CH2 procedente de IgG1, en la que el dominio CH2 de IgG1 presenta una o más mutaciones en posiciones seleccionadas de 239 y 332 y 330 (por ejemplo, las mutaciones pueden seleccionarse de S239D y I332E y A330L), de modo que la proteína de unión a antígenos presenta una función efectora potenciada, por ejemplo, en la que presenta una o más de las siguientes funciones, una ADCC potenciada o una CDC potenciada, por ejemplo, en la que tiene una ADCC potenciada y una CDC potenciada. En una realización, el dominio CH2 de IgG1 presenta las mutaciones S239D y I332E.

Se describe una proteína de unión a antígenos que comprende una región constante de cadena pesada quimérica y que presenta un perfil de glicosilación alterado. En una de estas realizaciones, la región constante de cadena pesada comprende al menos un dominio CH2 procedente de IgG3 y un dominio CH2 procedente de IgG1, y presenta un perfil de glicosilación alterado, de modo que la proporción de fucosa a manosa es de 0,8:3 o menor, por ejemplo, en la que la proteína de unión a antígenos está defucosilada de modo que dicha proteína de unión a antígenos presenta una función efectora potenciada en comparación con una proteína de unión a antígenos equivalente con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina que carece de dichas mutaciones y perfil de glicosilación alterado, por ejemplo, en la que presenta una o más de las siguientes funciones, una ADCC potenciada o una CDC potenciada, por ejemplo, en la que tiene una ADCC potenciada y una CDC potenciada.

En una realización alternativa, la proteína de unión a antígenos tiene al menos un dominio CH2 de IgG3 y al menos un dominio constante de cadena pesada procedente de IgG1, en la que ambos dominios CH2 de IgG se mutan según las limitaciones descritas en la presente.

En un aspecto se describe un método para producir una proteína de unión a antígenos descrita en la presente, que comprende las etapas de:

a) cultivar una célula hospedante recombinante que contiene un vector de expresión que contiene un ácido nucleico aislado, según se describe en la presente, y dicho vector de expresión comprende además una secuencia de ácido nucleico de Fc que codifica un dominio Fc quimérico que contiene restos aminoácidos del dominio Fc de IgG1 e IgG3, y en el que el gen FUT8 que codifica la alfa-1,6-fucosiltransferasa ha sido inactivado en la célula hospedante recombinante; y

b) recuperar la proteína de unión a antígenos.

Estos métodos para la producción de proteínas de unión a antígenos pueden realizarse, por ejemplo, empleando el sistema tecnológico ACCRETAMAB™, disponible en BioWa, Inc. (Princeton, NJ), que combina los sistemas tecnológicos POTELLIGENT™ y COMPLEGENT™ para producir una proteína de unión a antígenos que tiene ambas actividades ADCC y CDC potenciadas que son mayores con relación a un anticuerpo monoclonal por lo demás idéntico que carece de un dominio Fc quimérico y que presenta fucosa en el oligosacárido.

En otra realización de la presente solicitud se describe una proteína de unión a antígenos que comprende una región constante de cadena pesada mutada y quimérica, en la que dicha proteína de unión a antígenos presenta un perfil de glicosilación alterado, de tal forma que la proteína de unión a antígenos presenta una función efectora potenciada, por ejemplo, en la que presenta una o más de las siguientes funciones, una ADCC potenciada o una CDC potenciada. En una realización, las mutaciones se seleccionan de las posiciones 239 y 332 y 330, por ejemplo, las mutaciones se seleccionan de S239D e I332E y A330L. En otra realización, la región constante de cadena pesada comprende al menos un dominio CH2 procedente de IgG3 y un dominio CH2 procedente de IgG1. En una realización, la región constante de cadena pesada presenta un perfil de glicosilación alterado, de modo que la proporción de fucosa a manosa es de 0,8:3 o menor, por ejemplo, la proteína de unión a antígenos está defucosilada, de modo que dicha proteína de unión a antígenos presenta una función efectora potenciada en comparación con una proteína de unión a antígenos no quimérica equivalente o con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina que carece de dichas mutaciones y perfil de glicosilación alterado.

Otro medio para modificar las proteínas de unión a antígenos descritas en la presente implica aumentar la semivida *in vivo* de dichas proteínas mediante la modificación del dominio constante de inmunoglobulina o el dominio de unión de FcRn (receptor de Fc de neonato).

En mamíferos adultos, el FcRn, también conocido como receptor de Fc neonatal, desempeña un papel clave en el mantenimiento de los niveles de anticuerpos en suero actuando como un receptor protector que se une y rescata a anticuerpos del isotipo IgG de la degradación. Las moléculas de IgG son endocitadas por células endoteliales y, si se unen a FcRn, son recicladas hacia la circulación. Por contraste, las moléculas de IgG que no se unen a FcRn entran en las células y son dirigidas a la vía lisosómica, en donde son degradadas.

Se cree que el receptor FcRn está implicado en la eliminación de anticuerpos y en la transcitosis a través de tejidos (véase Junghans R.P. (1997), *Immunol. Res.*, 16, 29-57; y Ghetie *et al.* (2000), *Annu. Rev. Immunol.*, 18, 739-766).

Los restos de IgG1 humana que se ha determinado que interaccionan directamente con FcRn humano incluyen Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 y His435. Los cambios en cualquiera de estas posiciones descritas en esta sección podrían aumentar la semivida en suero y/o alterar propiedades efectoras de las proteínas de unión a antígenos.

5 Las proteínas de unión a antígenos descritas en la presente pueden presentar modificaciones en los aminoácidos que aumenten la afinidad del dominio constante, o uno de sus fragmentos, por el FcRn. El aumento de la semivida de IgG terapéuticas y de diagnóstico y otras moléculas bioactivas tiene muchos beneficios, que incluyen reducir la cantidad y/o la frecuencia de dosificación de estas moléculas. Por tanto, en una realización se describe una proteína de unión a antígenos o una proteína de fusión que comprende todo o una porción (una porción de unión a FcRn) de un dominio constante de IgG que presenta una o más de estas modificaciones de aminoácidos, y una proteína que no es IgG o una molécula que no es una proteína conjugada con dicho dominio constante de IgG modificado, en la que la presencia del dominio constante de IgG modificado aumenta la semivida *in vivo* de la proteína de unión a antígenos.

15 La publicación PCT n.º WO 00/42072 describe un polipéptido que comprende una región Fc variante con una afinidad de unión a FcRn alterada, comprendiendo dicho polipéptido una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 386, 388, 400, 413, 415, 424,433, 434,435, 436, 439, y 447 de la región Fc, en el que la numeración de los restos en la región Fc sigue el índice de la UE (Kabat *et al.*). La publicación PCT n.º WO 02/060919 A2 describe una IgG modificada que comprende un dominio constante de IgG que comprende una o más modificaciones de aminoácidos con relación a un dominio constante de IgG de tipo salvaje, en la que la IgG modificada tiene una semivida mayor comparada con la semivida de una IgG que presenta el dominio constante de IgG de tipo salvaje, y en la que dichas una o más modificaciones de aminoácidos se producen en una o más de las posiciones 251, 253, 255, 285-290, 308-314, 385-389, y 428-435.

25 Shields *et al.* (2001, J. Biol. Chem., 276:6591-604) emplean la mutagénesis de barrido de alanina para alterar restos en la región Fc de un anticuerpo de IgG1 humana y después se ensaya la unión a FcRn humano. Las posiciones que abrogan con eficacia la unión a FcRn cuando se cambian a alanina incluyen I253, S254, H435, e Y436. Otras posiciones muestran una reducción menos pronunciada en la unión como sigue: E233-G236, R255, K288, L309, S415, y H433. Varias posiciones de aminoácidos muestran una mejora en la unión a FcRn cuando se cambian a alanina; de modo notable, entre estas se encuentran P238, T256, E272, V305, T307, Q311, D312, K317, D376, 30 E380, E382, S424, y N434. Muchas otras posiciones de aminoácidos muestran una ligera mejora (D265, N286, V303, K360, Q362, y A378) o no producen cambios (S239, K246, K248, D249, M252, E258, T260, S267, H268, S269, D270, K274, N276, Y278, D280, V282, E283, H285, T289, K290, R292, E293, E294, Q295, Y296, N297, S298, R301, N315, E318, K320, K322, S324, K326, A327, P329, P331, E333, K334, T335, S337, K338, K340, Q342, R344, E345, Q345, Q347, R356, M358, T359, K360, N361, Y373, S375, S383, N384, Q386, E388, N389, N390, 35 K392, L398, S400, D401, K414, R416, Q418, Q419, N421, V422, E430, T437, K439, S440, S442, S444, y K447) en la unión a FcRn.

Se descubrió el efecto más pronunciado para los variantes de combinación con una unión mejorada a FcRn. A pH 6,0, el variante E380A/N434A muestra una unión más de 8 veces mayor a FcRn, con relación a la IgG1 nativa, comparado con 2 veces mayor para E380A y 3,5 veces mayor para N434A. La adición de T307A a esto produjo un aumento en 12 veces en la unión con relación a la IgG1 nativa. En una realización, la proteína de unión a antígenos descrita comprende las mutaciones E380A/N434A y presenta mayor unión a FcRn.

45 Dall'Acqua *et al.* (2002, J. Immunol., 169:5171-5180) describen la mutagénesis aleatoria y la selección de bancos de presentación de fagos de fragmentos Fc-bisagra de IgG1 humana contra FcRn de ratón. Describieron la mutagénesis aleatoria en las posiciones 251, 252, 254-256, 308, 309, 311, 312, 314, 385-387, 389, 428, 433, 434, y 436. El aumento mayor en la estabilidad del complejo de FcRn humano-IgG1 se produjo tras sustituir restos localizados en una banda a lo largo de la interfase de Fc-FcRn (M252, S254, T256, H433, N434, e Y436) y, en menor grado, tras sustituir restos en la periferia, tales como V308, L309, Q311, G385, Q386, P387, y N389. El variante con la mayor afinidad por FcRn se obtuvo combinando las mutaciones M252Y/S254T/T256E y H433K/N434F/Y436H, y mostró un aumento en 57 veces en la afinidad con relación a la IgG1 de tipo salvaje. El comportamiento *in vivo* de dicha IgG1 humana mutada mostró un aumento en casi 4 veces de la semivida en suero en mono cynomolgus comparado con la IgG1 de tipo salvaje.

Se describe un variante de una proteína de unión a antígenos con unión optimizada a FcRn. En una realización preferida, dicho variante de una proteína de unión a antígenos comprende al menos una modificación de aminoácido en la región Fc de dicha proteína de unión a antígenos, en el que dicha modificación se selecciona del grupo que consiste en 226, 227, 228, 230, 231, 233, 234, 239, 241, 243, 246, 250, 252, 256, 259, 264, 265, 267, 269, 270, 276, 284, 285, 288, 289, 290, 291, 292, 294, 297, 298, 299, 301, 302, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 315, 317, 320, 322, 325, 327, 330, 332, 334, 335, 338, 340, 342, 343, 345, 347, 350, 352, 354, 355, 356, 359, 360, 361, 362, 369, 370, 371, 375, 378, 380, 382, 384, 385, 386, 387, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 408, 411, 412, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 424, 426, 428, 433, 434, 438, 439, 440, 443, 444, 445, 446 y 447 de la región Fc comparado con dicho polipéptido parental, en la que la numeración de los aminoácidos en la región Fc sigue el índice de la UE en Kabat *et al.*

En otro aspecto de la solicitud, las modificaciones descritas son M252Y/S254T/T256E. Además, diversas publicaciones describen métodos para obtener moléculas fisiológicamente activas cuyas semividas se modifican introduciendo un polipéptido de unión a FcRn en las moléculas (documento WO 97/43316; patente de EE. UU. n.º 5.869.046; patente de EE. UU. n.º 5.747.035; documento WO 96/32478; documento WO 91/14438) o fusionando las moléculas con anticuerpos cuyas afinidades de unión a FcRn se han conservado, pero las afinidades por otros receptores de Fc se han reducido mucho (documento WO 99/43713) o fusionando dominios de unión a FcRn de anticuerpos (documento WO 00/09560; patente de EE. UU. n.º 4.703.039).

Además, también se proporcionan métodos para producir una proteína de unión a antígenos con menor semivida biológica. Una IgG variante en la que His435 está mutado a alanina produce la pérdida selectiva de la unión a FcRn y una semivida en suero significativamente reducida (Firan *et al.*, 2001, *International Immunology*, 13:993). La patente de EE. UU. n.º 6.165.745 describe un método para producir una proteína de unión a antígenos con menor semivida biológica mediante la introducción de una mutación en el segmento de ADN que codifica la proteína de unión a antígenos. La mutación incluye una sustitución de aminoácido en la posición 253, 310, 311, 433, o 434 del dominio de bisagra-Fc.

La expresión "anticuerpo no humano o uno de sus fragmentos de anticuerpo", tal como se emplea en la presente, se refiere a anticuerpos, o sus fragmentos, que se originan de cualquier especie diferente de la especie humana, en la que humano incluye anticuerpos quiméricos. La expresión "anticuerpo donante" se refiere a un anticuerpo (monoclonal y/o recombinante) que aporta las secuencias de aminoácidos de sus dominios variables, CDR u otros fragmentos funcionales, o sus análogos, a un primer compañero de inmunoglobulina, para proporcionar una región codificadora de inmunoglobulina alterada que produce un anticuerpo alterado expresado con la especificidad antigénica y la actividad neutralizante característica del anticuerpo donante.

La expresión "anticuerpo aceptor" se refiere a un anticuerpo (monoclonal y/o recombinante) heterólogo con respecto al anticuerpo donante, que aporta todas (o cualquiera de sus porciones, pero preferiblemente todas) las secuencias de aminoácidos que codifican sus regiones de marco de cadena pesada y/o ligera y/o sus regiones constantes de cadena pesada y/o ligera al primer compañero de inmunoglobulina. El anticuerpo humano es el anticuerpo aceptor. La expresión "secuencia aceptora humana", tal como se emplea en la presente, se refiere a un marco de un anticuerpo, o uno de sus fragmentos de anticuerpo, que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de VH o VL derivado de un anticuerpo humano, o uno de sus fragmentos de anticuerpo, o un marco de secuencia consenso humano en el que cual pueden incorporarse CDR de una especie no humana.

El término "incorporación" de CDR o regiones hipervariables, tal como se emplea en la presente, incluye cualquier medio mediante el cual las CDR no humanas se sitúan dentro del marco aceptor humano. Se apreciará que esto puede lograrse de varias formas, por ejemplo, pueden generarse ácidos nucleicos que codifican la secuencia de aminoácidos deseada mutando los ácidos nucleicos que codifican la secuencia de dominio variable no humana de modo que sus restos de marco se cambian a restos del marco aceptor humano, o mutando un ácido nucleico que codifica la secuencia de dominio variable humana de modo que sus CDR se cambian a restos no humanos, o sintetizando ácidos nucleicos que codifiquen la secuencia deseada. En una realización, la secuencia final se genera por ordenador.

La presente invención se describirá a continuación solo como ejemplo. Las reivindicaciones adjuntas pueden incluir una generalización de uno o más de los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación y selección de anticuerpos monoclonales

1.1 Estrategia de inmunización

Se identificó el mAb anti-OSM humana S168110G08(1)1A09 ("10G8") a partir de hibridomas derivados de ratones inmunizados con OSM humana glicosilada recombinante (K598). Se inmunizaron ratones SJL hembra (n = 2, Harlan, Reino Unido, HOST SP06-06031) de modo convencional empleando un total de 10 µg de proteína por vía intraperitoneal con adyuvante similar a AS02. Las inmunizaciones de refuerzo se realizaron con 5 µg de proteína. Se tomaron muestras de sangre después de cada refuerzo y se eligió el ratón con la mejor respuesta (168#4) para la fusión con hibridoma (R16092/177-198). Se retiró el bazo, se disgregó y se realizó una fusión de células somáticas inducida por PEG1500 con células de mieloma de ratón X63 AG8 653.GFP.Bcl-2.11 (BioCat 112754; R17209/58). La fusión se cultivó en placas de 10 x 96 pocillos y 5 bandejas Nunc Omnitrays en metilcelulosa que contenía un medio semisólido. Las colonias se escogieron del medio semisólido y se trasladaron a placas de 5 x 96 pocillos.

1.2 Estrategia de selección

1.2.1 Selección primaria

La selección primaria para los anticuerpos de apoyo anti-OSM se basó en la selección del material de hibridoma capaz de unirse a OSM humana y, para seleccionar las moléculas anti-sitio II, capaz de inhibir la unión de la OSM humana y de cynomolgus al receptor gp130. Los sobrenadantes de hibridoma positivos de estas selecciones se

analizaron mediante la cinética de la constante de disociación de BIACore para seleccionar los hibridomas de mejor unión.

5 Se recuperaron más de 3000 clones de las fusiones, de los cuales 86 mostraron una unión apreciable a la OSM humana mediante ELISA de unión. El análisis de la actividad anti-sitio II se realizó en hibridomas positivos mediante ELISA de gp130 con OSM humana y de cynomolgus. Los clones de hibridoma que inhibieron la unión de la OSM humana y de cynomolgus al gp13 humano se sometieron a un análisis de la cinética de la constante de disociación de BIACore. Los cuatro mejores clones que unieron la OSM humana mediante el análisis de la constante de disociación, 10G8, 9G2, 3E3 y 2B7, se monoclonaron y se volvieron a seleccionar. No se observó diferencia en la actividad de unión con BIACore y ELISA ni en la inhibición de gp130 entre los monoclonos de cada hibridoma. Los clones hijos, 10G8.A9, 9G2.C1, 2B7.A6 y 3E3.A1 se crioconservaron y se emplearon para el aumento de escala sin suero y la purificación. Estos se sometieron a una selección secundaria.

1.2.2 Selección secundaria

15 La selección secundaria para clasificar los cuatro clones hijos, 10G8/A9, 9G2/C1, 2B7/A6 y 3E3/A1, incluyó un análisis de la cinética de BIACore frente a OSM humana/de cynomolgus; ELISA de gp130 humano con OSM humana/de cynomolgus; ensayo de neutralización de células KB con OSM humana/de cynomolgus. Además de esto, se evaluó la capacidad para neutralizar OSM humana derivada de neutrófilos endógena, la conservación de la capacidad de neutralización en suero AB humano al 25% y la reactividad frente a LIF humano.

Análisis BIACore:

20 El análisis BIACore demostró que 10G8, 9G2, 3E3 y 2B7 tenían afinidades mayores por la OSM humana que un anticuerpo anti-OSM de ratón no competitivo alternativo (15E10) (tabla 1). El 10G8 mostró la mayor afinidad por la OSM humana (aproximadamente 550 pM) y de cynomolgus (aproximadamente 310 pM). Comparado con 15E10, 10G8 tiene una afinidad mayor en 8 veces/0,9 unidades logarítmicas por la OSM humana, y una afinidad mayor en 11 veces/1 unidad logarítmica por la OSM de cynomolgus. Ambos 10G8 y 9G2 mostraron mayor afinidad por la OSM de OSM frente a la OSM humana.

25 Tabla 1: Cinética de BIACore - Cuatro anticuerpos principales de apoyo anti-OSM, 10G8, 9G2, 3E3 y 2B7, comparados con 15E10

mAb	OSM	ka (constante de asociación)	kd (constante de disociación)	KD nM
10G8	Humana	1,12E+05	6,14E-05	0,55
	Cynomolgus	9,69E+04	2,99E-05	0,308
9G2	Humana	7,52E+04	1,21E-04	1,60
	Cynomolgus	6,14E+04	4,76E-05	0,75
3E3	Humana	1,95E+05	2,53E-04	1,30
	Cynomolgus	1,71E+05	5,60E-04	3,28
2B7	Humana	1,21E+05	2,54E-04	2,09
	Cynomolgus	1,00E+05	9,33E-04	9,31
15E10	Humana	1,94E+05	8,69E-04	4,48
	Cynomolgus	1,77E+05	5,97E-04	3,37

ELISA de gp130 humano:

30 El ELISA de gp130 humano emplea unos niveles relativamente altos de OSM (25 ng/ml), lo cual reduce su capacidad para separar los anticuerpos de alta afinidad de los anticuerpos de baja afinidad, puesto que el ligando se encuentra en exceso. Tras cuatro repeticiones de este ensayo, se demostró que 10G8 es el anticuerpo más potente para bloquear la unión de OSM humana y de cynomolgus al receptor gp130 en este ensayo (figura 1; tabla 2).

Tabla 2: ELISA de gp130 humano - Resumen de cuatro repeticiones de un ELISA de gp130 humano para clasificar la actividad de 10G8, 9G2, 3E3 y 2B7 frente a la OSM humana y de cynomolgus. Se añadió un anticuerpo de ratón no competitivo 15E10 y un anticuerpo de trabajo de control negativo para fines comparativos.

Clasificación de OSM humana	Anticuerpo	OSM humana, CI50 promedio $\mu\text{g/ml} \pm \text{DE}$	OSM de cynomolgus, CI50 promedio $\mu\text{g/ml} \pm \text{DE}$ (clasificación OSM de cynomolgus)
1	10G8	0,06 \pm 0,01 (400 pM)	0,01 \pm 0,00 (1) (40 pM)
2	2B7	0,08 \pm 0,02 (533 pM)	0,14 \pm 0,04 (6) (993 pM)
3	9G2	0,16 \pm 0,04 (1,1 nM)	0,03 \pm 0,04 (4) (200 pM)
4	15E10	0,19 \pm 0,07 (1,3 nM)	0,03 \pm 0,05 (3) (200 pM)
5	3E3	0,19 \pm 0,04 (1,3 nM)	0,06 \pm 0,07 (5) (400 pM)

- 5 El ensayo de gp130 humano se repitió en presencia de suero AB humano al 25%. Dos repeticiones de este ensayo demostraron que los cuatro anticuerpos principales 10G8, 9G2, 3E3 y 2B7, junto con 15E10, conservaron su capacidad para bloquear la unión de OSM humana y de cynomolgus a gp130 (los datos no se muestran).

Ensayo de neutralización de células KB:

- 10 La OSM induce la liberación de IL-6 desde células KB (una línea de células epiteliales humana que expresa el ARNm para los receptores de OSM y gp130). Brevemente, células KB se estimularon con OSM 1 ng/ml +/- diferentes concentraciones de anticuerpos durante 16-18 horas a 37 °C, y la IL6 liberada se controló mediante ELISA. El ensayo de neutralización de células KB emplea una cantidad reducida de OSM comparado con el ensayo de gp130 (1 ng/ml frente a 25 ng/ml). Esto hace que sea un ensayo más discriminante para separar los neutralizadores de alta afinidad de los neutralizadores de baja afinidad. Comparado con el anticuerpo 15E10, 10G8 fue más potente en 15 veces/1,2 unidades logarítmicas contra la OSM humana en el ensayo de neutralización de células KB. A partir de tres repeticiones del ensayo, 10G8 se clasificó en primer lugar en todas las repeticiones, dando un valor promedio de CI50 de 8 ng/ml frente a la OSM humana, y de 6 ng/ml frente a la de cynomolgus (figura 2; tabla 3). En este ensayo, 9G2 se clasificó en segundo lugar, con una CI50 de 18 ng/ml y 15ng/ml contra la OSM humana y de cynomolgus, respectivamente.

- 20 Tabla 3: Ensayo de neutralización de células KB - Resumen de tres repeticiones de un ensayo de neutralización de células KB para clasificar la actividad de 10G8, 9G2, 3E3 y 2B7 frente a la OSM humana y de cynomolgus. Se añadió el anticuerpo 15E10 para fines comparativos. Se empleó el anticuerpo de trabajo como control negativo.

Clasificación de OSM humana	Anticuerpo	OSM humana, CI50 promedio $\mu\text{g/ml} \pm \text{DE}$	OSM de cynomolgus, CI50 promedio $\mu\text{g/ml} \pm \text{DE}$ (clasificación OSM de cynomolgus)
1	10G8	0,008 \pm 0,003 (53 pM)	0,006 \pm 0,002 (1) (40 pM)
2	9G2	0,018 \pm 0,008 (120 pM)	0,015 \pm 0,006 (2) (100 pM)
3	2B7	0,049 \pm 0,003 (327 pM)	0,344 \pm 0,186 (6) (2,3 nM)
4	3E3	0,054 \pm 0,034 (360 pM)	0,150 \pm 0,013 (5) (1 nM)
5	15E10	0,279 \pm 0,161 (1,9 nM)	0,035 \pm 0,013 (4) (233 pM)

- 25 En presencia de suero AB humano al 25%, 10G8, 9G2 y 3E3 conservaron su capacidad para neutralizar la OSM humana y de cynomolgus (figura 3). 15E10 y 2B7 no pudieron producir curvas ajustadas de una calidad suficiente para calcular los valores de CI50. Al igual que con el ensayo de células KB séricas no humanas, el anticuerpo más potente fue 10G8, y 9G2 se clasificó en segundo lugar. Se observó cierta disminución en la actividad en presencia del suero AB al 25%. Hasta cierto punto, esto puede ser debido a que el suero de AB interfiere con la lectura de este ensayo. Se observaron unos niveles de fondo de IL-6 más altos en este ensayo que en el suero no humano.

- 30 OSM humana endógena (ensayo de gp130):

Los cuatro anticuerpos principales, 10G8, 9G2, 3E3 y 2B7, así como el anticuerpo 15E10, inhibieron la OSM humana endógena procedente de cuatro donantes distintos (figura 4). Esta OSM nativa fue generada mediante la estimulación con GM-CSF de neutrófilos humanos sanos.

Reactividad de LIF humano (ensayo de neutralización de células KB):

El LIF humano es el miembro de la familia de IL-6 más cercano a la OSM humana. Estudios iniciales han demostrado que no se produce reactividad entre 10G8, 9G2, 3E3 y 2B7 y el LIF humano, lo cual indica que estos anticuerpos son específicos de OSM (figura 5).

5 Reactividad de OSM de mono tití (ensayo de neutralización de células KB):

Se demostró que las cuatro moléculas principales, 10G8, 9G2, 3E3 y 2B7, neutralizaban la OSM de mono tití en el ensayo de neutralización de células KB (figura 6). 15E10 y un panel de otros tres anticuerpos anti-OSM humana, 10D3DLE, OM4.11.17 y OM4.11.31, tampoco neutralizaron la OSM de mono tití.

10 Tras dos repeticiones del ensayo, 10G8 fue el neutralizador más potente de OSM de mono tití, siendo 9G2 el segundo.

1.2.3 Anticuerpos monoclonales seleccionados para la progresión

De los cuatro anticuerpos, se eligió 10G8 como anticuerpo principal para la quimerización basándose en que se clasificó el primero en los todos los ensayos comentados anteriormente. También se seleccionó 9G2 para la quimerización como molécula de apoyo en el caso de presentarse dificultades durante la humanización.

15 1.3 Modificación de anticuerpos y selección de la serie de anticuerpos principales

1.3.2 Secuencias de la región variable

Los genes variables de los cuatro anticuerpos monoclonales seleccionados, 2B7, 3E3, 9G2 y 10G8, se aislaron y secuenciaron en paralelo para poder generar los correspondientes anticuerpos quiméricos. Se extrajo el ARN total de los sedimentos de células de hibridoma. Las secuencias codificadoras de los genes V de cadena pesada y ligera se amplificaron mediante RT-PCR o 5'RACE y después se clonaron con TA para el análisis de la secuencia. La amplificación de los genes V se realizó por duplicado para cada anticuerpo para permitir la posterior verificación de las secuencias correctas de dos reacciones independientes. Se obtuvo la secuencia de las cadenas variable pesada y variable ligera de los 4 clones de hibridoma. El alineamiento de las secuencias de proteína demostró que los anticuerpos tienen un alto grado de identidad de secuencia en las regiones de cadena variable pesada y ligera (figuras 7 y 8). Las secuencias de las regiones variables de cadena pesada y ligera de estos anticuerpos se indican en SEQ ID NO:26-48. Véase la tabla A.

25 La comparación de la secuencia entre los cuatro anticuerpos monoclonales principales y el anticuerpo 15E10 mostró solo 50-60% de identidad con las cadenas ligera (figura 9) o pesada (figura 10). Esto indica que estos anticuerpos se unen a epitopos distintos de los reconocidos por el anticuerpo 15E10.

30 1.3.3 Clonación de anticuerpos

1.3.3.1 Construcción de quimeras

Ambos 10G8 y 9G2 se generaron como anticuerpos quiméricos injertando las regiones VH y VL de ratón descritas anteriormente en regiones constantes kappa humanas y gamma 1 Fc de tipo salvaje humana, respectivamente. Los anticuerpos quiméricos se emplearon para confirmar la funcionalidad de las regiones V de ratón clonadas y se purificaron y usaron como referencia cuando se ensayan construcciones humanizadas. Se diseñaron cebadores de PCR basándose en las secuencias de ADN 5' y 3' determinadas en 2.3.1 para que incluyesen los sitios de restricción necesarios para la clonación en los vectores de expresión de mamífero Rlx y pTT5. También se diseñaron cebadores para reemplazar la secuencia señal nativa por la secuencia señal Campath. Se diseñaron sitios Hind III y Spe I para enmarcar al dominio VH y permitir la clonación en un vector Rld o pTT5 modificado que contiene la región $\gamma 1$ C humana. La introducción de un sitio Spe I en la secuencia del marco 4 produjo un único cambio de aminoácido en FR4 en la posición 108. Para la región VH de 9G2, un sitio Spel interno está presente en el extremo 5' de la secuencia de ADN, y se diseñó un cebador de PCR para la quimera de 9G2 para eliminar este sitio Spel interno. Se diseñaron sitios Hind III y BsiWI para enmarcar al dominio VL y permitir la clonación en un vector Rld o pTT5 modificado que contiene la región κ C humana.

45 Los clones con las secuencias de VH y VL correctas se identificaron y se prepararon plásmidos para la expresión en células CHO o HEK.

1.3.3.2 Expresión de quimeras

Los plásmidos Rld y Rln que codifican los dominios VH y VL de 10G8 y 9G2 quiméricos se cotransfectaron, respectivamente, en células CHOE1A mediante electroporación y se expresaron en un cultivo celular policlonal. Los plásmidos pTT que codifican los dominios VH y VL de 10G8 y 9G2 quiméricos se cotransfectaron en células HEK293 empleando una metodología de transfección de lípidos para permitir la expresión episódica transitoria, ya que la transfección en el sistema de expresión episódico puede producir potencialmente cantidades de mg del anticuerpo. Los anticuerpos quiméricos (10G8c y 9G2c) producidos se purificaron de los sobrenadantes del cultivo celular

mediante una cromatografía de afinidad sobre proteína A-Sepharose. Se comprobó la calidad de los anticuerpos purificados mediante análisis de SDS-PAGE y cromatografía de exclusión molecular.

1.3.3.3 Datos del ensayo de unión

ELISA de unión de OSM humana:

- 5 Ambas quimeras de 10G8 y 9G2 se unieron con éxito a la OSM humana en un grado mayor que la quimera de 15E10 (15E10c) (figura 11). Se realizó un ELISA directo en el que la OSM humana fue revestida a 1 µg/ml, y los anticuerpos unidos se detectaron empleando anti-IgG humana.

Análisis BIACore:

- 10 El análisis BIACore demostró que había poca o ninguna pérdida de la unión a OSM humana o de cynomolgus en las moléculas 10G8 y 9G2 quiméricas comparadas con los anticuerpos parentales de ratón (tabla 4). La quimera de 10G8 se clasificó en primer lugar (654 pM), por delante de la quimera de 9G2 (1,33 nM). Todos los anticuerpos mostraron una mayor afinidad por la OSM de cynomolgus frente a la OSM humana.

Tabla 4: Cinética de BIACore - Cinética de unión de los anticuerpos 10G8, quimera de 10G8, 9G2 y quimera de 9G2.

	OSM de cynomolgus			OSM humana		
	Ka (M-1.s-1)	Kd (s-1)	KD (nM)	Ka (M-1.s-1)	Kd (s-1)	KD (nM)
Quimera de 10G8	2,37E+5	1,14E-4	0,480	2,33E+5	1,52E-4	0,654
10G8 de ratón	9.69e+4	2.99e-5	0,308	1.12e+5	6.14e-5	0.549
Quimera de 9G2	1,27E+5	9,99E-5	0,787	1,26E+5	1,68E-4	1,333
9G2 de ratón	6,14e+4	4,76e-5	0,775	7,52e+4	1,21e-4	1,60

- 15 1.3.3.4 Datos del ensayo funcional

ELISA de gp130 humano:

- 20 El ELISA de gp130 humano emplea unos niveles relativamente altos de OSM (25 ng/ml), lo cual reduce su capacidad para separar los anticuerpos de alta afinidad de los anticuerpos de baja afinidad, puesto que el ligando se encuentra en exceso. Tras tres repeticiones de este ensayo, se demostró que la quimera de 10G8 es el anticuerpo más eficaz para inhibir a unión de OSM humana y de cynomolgus al receptor gp130. Los valores del 10G8 parental de ratón y de la quimera de 10G8 fueron muy similares en este ensayo (figura 12; tabla 5). No se observó una diferencia significativa entre 9G2 y su quimera.

- 25 Tabla 5: ELISA de gp130 humano - Resumen de tres repeticiones de un ELISA de gp130 humano para clasificar la actividad de 10G8, quimera de 10G8, 9G2 y quimera de 9G2 frente a la OSM humana y de cynomolgus. Se añadió el anticuerpo 15E10 para fines comparativos. Se empleó un anticuerpo de trabajo como control negativo.

Clasificación de OSM humana	Anticuerpo	OSM humana, CI50 promedio µg/ml±DE	OSM de cynomolgus, CI50 promedio µg/ml±DE (clasificación OSM de cynomolgus)
1	Quimera de 10G8	0,037±0,035 (247 pM)	0,016±0,015 (1) (107 pM)
2	9G2	0,038±0,004 (253 pM)	0,049±0,059 (5) (327 pM)
3	10G8	0,044±0,034 (293 pM)	0,017±0,013 (2) (113 pM)
4	Quimera de 9G2	0,078±0,102 (520 pM)	0,028±0,033 (3) (187 pM)
5	15E10	0,250±0,403 (1,7 nM)	0,071±0,096 (6) (473 pM)

El ensayo de gp130 humano se repitió en presencia de suero AB humano para la OSM humana y de cynomolgus. Todas las moléculas conservaron su actividad en suero al 25%. Frente a la OSM humana y de cynomolgus, la quimera de 10G8 y el 10G8 parental de ratón se clasificaron en primer y segundo lugar, respectivamente. Los

valores de CI50 de estos dos anticuerpos fueron similares. No se observó una diferencia significativa entre la quimera de 9G2, que se clasificó en tercer lugar, y su anticuerpo parental de ratón (los datos no se muestran).

Ensayo de neutralización de células KB:

5 El 10G8 parental de ratón se comportó de una manera similar a la quimera (figura 13; tabla 6). El 9G2 parental de ratón y la quimera se clasificaron en tercer y cuarto lugar, respectivamente, en este ensayo.

Tabla 6: Ensayo de neutralización de células KB - Resumen de tres repeticiones de un ensayo de neutralización de células KB para clasificar la actividad de 10G8, quimera de 10G8, 9G2 y quimera de 9G2 frente a la OSM humana y de cynomolgus. Se añadió el anticuerpo 15E10 para fines comparativos. Se empleó un anticuerpo de trabajo como control negativo.

Clasificación de OSM humana	Anticuerpo	OSM humana, CI50 promedio $\mu\text{g/ml} \pm \text{DE}$	OSM de cynomolgus, CI50 promedio $\mu\text{g/ml} \pm \text{DE}$ (clasificación OSM de cynomolgus)
1	Quimera de 10G8	0,021 \pm 0,008 (140 pM)	0,008 \pm 0,007 (1) (53 pM)
2	9G2	0,054 \pm 0,066 (360 pM)	0,034 \pm 0,047 (3) (227 pM)
3	10G8	0,163 \pm 0,197 (1,1 nM)	0,046 \pm 0,025 (4) (307 pM)
4	Quimera de 9G2	0,231 \pm 0,287 (1,5 nM)	0,031 \pm 0,008 (2) (207 pM)
5	15E10	Fuera de alcance	0,057 \pm 0,036 (5) (380 pM)

10

En presencia de suero AB humano al 25%, 10G8, quimera de 10G8, 9G2 y quimera de 9G2 conservaron su capacidad para neutralizar la OSM humana y de cynomolgus (figura 14). Se observó cierta disminución en la actividad en presencia del suero AB al 25%. Aunque los valores de CI50 no pudieron calcularse con una concentración inicial del anticuerpo de 1 $\mu\text{g/ml}$, se observó un claro efecto de neutralización de la titulación para todos los anticuerpos, excepto el control negativo no relacionado. Esta disminución en la actividad puede ser debida, hasta cierto punto, a que el suero de AB interfiere con la lectura de este ensayo. Se observaron unos niveles de fondo de IL-6 más altos en este ensayo que en el suero no humano.

15

OSM humana endógena (ensayo de gp130):

20

10G8, quimera de 10G8, 9G2 y quimera de 9G2 inhibieron la OSM humana endógena procedente de dos donantes distintos (figura 15). En estos dos donantes, 10G8 y quimera de 10G8 se clasificaron conjuntamente en primer lugar, y 9G2 y su quimera se clasificaron en tercer y cuarto lugar, respectivamente (tabla 7). Esta OSM nativa fue generada mediante la estimulación con GM-CSF de neutrófilos humanos sanos.

25

Tabla 7: Ensayo de OSM y gp130 endógenos humanos - Resumen de dos donantes de neutrófilos en el ELISA de gp130 para evaluar la actividad de 10G8, quimera de 10G8, 9G2 y quimera de 9G2 frente a la OSM humana endógena. Se empleó un anticuerpo de trabajo como control negativo.

Clasificación	mAb	CI50 $\mu\text{g/ml} \pm \text{DE}$
1=	10G8	0,009 \pm 0,001 (60 pM)
1=	Quimera de 10G8	0,009 \pm 0,000 (60 pM)
3	Quimera de 9G2	0,017 \pm 0,001 (113 pM)
4	9G2	0,020 \pm 0,004 (133 pM)

Reactividad de LIF humano (ensayo de neutralización de células KB):

30

El LIF humano es el miembro de la familia de IL-6 más cercano a la OSM humana. Tres repeticiones del ensayo de células KB de LIF humano demostraron que 10G8, quimera de 10G8, 9G2 y quimera de 9G2 no neutralizaban el LIF humano. Un anticuerpo anti-LIF humano disponible en el mercado sí neutralizó el LIF en este ensayo (figura 16). Esto demuestra que estos anticuerpos son específicos de OSM.

Ejemplo 2: Humanización

2.1.1 Estrategia de humanización de la cadena pesada

Tras el análisis BLAST de las bases de datos de la línea germinal del gen V humano, la línea germinal humana IGHV3_7, que presenta 74% de identidad (incluyendo las CDR) con la secuencia de la cadena pesada variable de 10G8, se seleccionó como el marco aceptor preferido para la humanización. La región V de la línea germinal se combinó por ordenador con un FR4 adecuado, en este caso el minigén JH2 (Kabat, vol. II), basándose en la similitud de secuencia. Los seis primeros restos del minigén JH2 se encuentran dentro de la región CDR3, que es reemplazada por la CDR entrante procedente del anticuerpo donante. Se generaron tres variantes de cadena pesada humanizadas basándose en la comparación de las secuencias y el posible impacto sobre la función del anticuerpo. La construcción H0 es un injerto directo de las CDR de ratón procedentes de 10G8 (empleando la definición de Kabat) en el marco aceptor humano seleccionado anteriormente. Las construcciones H1 y H2 se basan en H0, y ambas incorporan una mutación en el marco adicional que es diferente en cada construcción (posiciones 2 y 105, respectivamente).

2.1.2 Humanización de la cadena ligera

Tras el análisis BLAST de las bases de datos de la línea germinal del gen V humano, la línea germinal humana IGKV4_1, que presenta 64% de identidad (incluyendo las CDR) con la secuencia de la cadena ligera variable de 10G8, se seleccionó como el marco aceptor preferido para la humanización. La región V de la línea germinal se combinó por ordenador con un FR4 adecuado, en este caso el minigén 4 de la región J kappa (Kabat, vol. II), basándose en la similitud de secuencia. Los dos primeros restos del minigén JK-4 se encuentran dentro de la región CDR3 y son idénticos a los últimos dos restos en la CDR3 de la cadena ligera de 10G8 de ratón. Se generaron cinco variantes de cadena ligera humanizadas basándose en la comparación de las secuencias y el posible impacto sobre la función del anticuerpo. La construcción L0 es un injerto directo de las CDR de ratón procedentes de 10G8 (empleando la definición de Kabat) en el marco aceptor humano seleccionado anteriormente. Las construcciones L1, L2 y L3 se basan en L0, y cada una incorpora una mutación en el marco adicional que es diferente en cada construcción (posiciones 46, 84 y 103, respectivamente). La construcción L4 incorpora las tres retromutaciones anteriores.

2.1.3 Construcción de vectores humanizados

Las secuencias de ADN de las regiones variables humanizadas se optimizaron empleando el programa informático LETO 1.0 (Entelechon GmbH) y se sintetizaron *de novo* mediante la unión de oligonucleótidos solapantes y una amplificación por PCR. Los cebadores incluyen sitios de restricción para la clonación en vectores de expresión de mamífero, y secuencias señal de inmunoglobulina para la secreción. Las regiones pesadas variables humanizadas H0-H2 se clonaron en vectores de expresión de mamífero que contenían la región constante gamma 1 humana empleando HindIII y SpeI. En paralelo, las regiones ligeras variables humanizadas L0-L4 se clonaron en vectores de expresión de mamífero que contenían la región constante kappa humana empleando HindIII y BsiWI.

2.1.4 Selección inicial del panel de variantes humanizados

Para seleccionar y estrechar el panel de variantes humanizados (3 de cadena pesada x 5 de cadena ligera = 15), los anticuerpos se expresaron en células HEK y se evaluaron mediante ensayos BIAcore, ELISA y funcionales.

2.2 Bioensayos de anticuerpos 10G8 humanizados: quimeras contra mAb humanizados

2.2.1 Selección secundaria

La selección secundaria para clasificar los anticuerpos 10G8 humanizados, listados en la tabla 9, incluyó un análisis de la cinética de BIAcore frente a OSM humana; ELISA de gp130 humano con OSM humana/de cynomolgus; ensayo de neutralización de células KB con OSM humana/de cynomolgus. Además de esto, se evaluó la capacidad para bloquear la unión de gp130 en suero AB humano al 25%.

Análisis BIAcore:

El análisis BIAcore con los sobrenadantes de la transfección demostró que los variantes humanizados L1 y L4 tenían afinidades mayores por la OSM humana que los variantes humanizados L0, L2 y L3 (tabla 8). Estas mutaciones de la cadena ligera mejoran la afinidad comparado con el injerto directo por sí solo (H0L0) y la quimera de 10G8. Los variantes de cadena pesada, H1 y H2, producen poco impacto sobre la afinidad de los anticuerpos frente al injerto directo, H0.

El análisis de los variantes L1 y L4 purificados y aumentados de escala demostró que existían muy pocas diferencias entre las afinidades de estos mAb por OSM humana y de cynomolgus (tabla 9).

Tabla 8: Cinética de BIAcore - Cinética de unión de la OSM humana de quince sobrenadantes de transfección de anticuerpos 10G8 humanizados de apoyo anti-OSM comparada con la quimera de 10G8

	Ka (M-1.s-1)	Kd (s-1)	KD (nM)
H0L0	3,69E+5	1,60E-4	0,435
H0L1	3,98E+5	9,95E-5	0,250
H0L2	3,65E+5	1,37E-4	0,375
H0L3	3,74E+5	1,45E-4	0,388
H0L4	4,13E+5	1,11E-4	0,268
H1L0	3,81E+5	1,62E-4	0,425
H1L1	4,00E+5	9,99E-5	0,250
H1L2	3,65E+5	1,63E-4	0,445
H1L3	3,71E+5	1,27E-4	0,344
H1L4	3,77E+5	1,30E-4	0,344
H2L0	3,63E+5	1,45E-4	0,398
H2L1	3,94E+5	1,13E-4	0,286
H2L2	3,68E+5	1,42E-4	0,387
H2L3	3,76E+5	1,50E-4	0,398
H2L4	4,48E+5	1,01E-4	0,226
sobrenadante de quimera de 10G8	2,52E+5	1,03E-4	0,407
quimera de 10G8 purificada	2,57E+5	1,05E-4	0,407

5 Tabla 9: Cinética de BIAcore - Cinética de unión a OSM humana y de cynomolgus de los lotes purificados de los anticuerpos variantes L1 y L4 de 10G8 humanizados anti-OSM comparada con la quimera de 10G8

	OSM de cynomolgus			OSM humana		
	Ka (M-1.s-1)	Kd (s-1)	KD (nM)	Ka (M-1.s-1)	Kd (s-1)	KD (nM)
H0L1	4,26E+5	1,07E-4	0,251	3,87E+5	1,37E-4	0,355
H1L1	4,28E+5	1,10E-4	0,258	3,75E+5	1,66E-4	0,443
H2L1	4,14E+5	1,24E-4	0,299	3,83E+5	1,40E-4	0,365
H0L4	4,18E+5	1,01E-4	0,242	3,74E+5	1,40E-4	0,374
H1L4	4,21E+5	1,11E-4	0,264	3,65E+5	1,35E-4	0,370
H2L4	4,41E+5	9,01E-5	0,205	3,80E+5	1,35E-4	0,356
Quimera de 10G8	2,53E+5	9,95E-5	0,394	2,41E+5	1,25E-4	0,518
15E10h	5,26E+5	3,10E-4	0,590	4,29E+5	6,15E-4	1,43

Ensayo de neutralización de células KB:

5 El ensayo de neutralización de células KB emplea una cantidad reducida de OSM comparado con el ensayo de gp130 (1 ng/ml frente a 25 ng/ml). Esto hace que sea un ensayo más discriminante para separar los neutralizadores de alta afinidad de los neutralizadores de baja afinidad. Una selección con el ensayo de células KB de las construcciones de los variantes H0, H1, H2, L0, L1, L2, L3 y L4 iniciales muestra la superioridad de las construcciones L1 (los datos no se muestran). Estas, junto con los variantes L4 que tuvieron una buena actuación en los análisis BIACore, se produjeron en lotes más grandes para posteriores análisis. A partir de tres repeticiones del ensayo, los variantes L1 de 10G8 humanizados se clasificaron en primer lugar, dando un valor promedio de CI50 de 14 ng/ml frente a la OSM humana, y de 10 ng/ml frente a la de cynomolgus (figura 17; tabla 10).

10 Tabla 10: Ensayo de neutralización de células KB - Resumen de tres repeticiones de un ensayo de neutralización de células KB para clasificar la actividad de los variantes L1 y L4 de 10G8 humanizados frente a la OSM humana y de cynomolgus

Clasificación de OSM humana	Anticuerpo	OSM humana, CI50 promedio $\mu\text{g/ml} \pm \text{DE}$	OSM de cynomolgus, CI50 promedio $\mu\text{g/ml} \pm \text{DE}$ (clasificación OSM de cynomolgus)
1	H1L1	0,013 \pm 0,001 (83 pM)	0,010 \pm 0,002 (3) (67 pM)
2	H2L1	0,014 \pm 0,007 (93 pM)	0,013 \pm 0,003 (6) (14 pM)
3	H0L1	0,015 \pm 0,009 (102 pM)	0,007 \pm 0,002 (1) (21 pM)
4	H1L4	0,016 \pm 0,015 (107 pM)	0,011 \pm 0,007 (4) (10 pM)
5	H0L4	0,018 \pm 0,012 (118 pM)	0,012 \pm 0,009 (5) (49 pM)
6	H2L4	0,022 \pm 0,015 (147 pM)	0,016 \pm 0,015 (7) (58 pM)
7	Quimera de 10G8	0,022 \pm 0,022 (144 pM)	0,008 \pm 0,005 (2) (100 pM)

15 Los variantes L1 de 10G8 humanizados se seleccionaron para su posterior ensayo puesto que mostraron mayor actividad biológica en el ensayo de células KB, comparados con los variantes L4. Los variantes L4 tienen un rendimiento de producción muy bajo en el sistema CHO-E1a y esto los excluyó de posteriores análisis.

ELISA de gp130 humano:

20 El ELISA de gp130 humano emplea unos niveles relativamente altos de OSM (25 ng/ml), lo cual reduce su capacidad para separar los anticuerpos de alta afinidad de los anticuerpos de baja afinidad, puesto que el ligando se encuentra en exceso. Tras dos repeticiones de este ensayo con los variantes L1 de 10G8 humanizados, se demostró que los tres variantes son equipotentes para bloquear la unión de OSM humana y de cynomolgus al receptor gp130 en este ensayo (figura 18).

El ensayo de gp130 humano se repitió en presencia de suero AB humano al 25%. Dos repeticiones de este ensayo demostraron que todos los anticuerpos, los variantes H0L1, H1L1 y H2L1 de 10G8 humanizados, conservaron su capacidad para bloquear la unión de OSM humana y de cynomolgus a gp130 (los datos no se muestran).

25 2.3 Aislamiento de los fragmentos Fab y cristalización del complejo 10G8 mAb-OSM

2.3.2 Generación de los fragmentos Fab

30 Se generaron fragmentos Fab a partir del anticuerpo parental 10G8 mediante digestión con papaína inmovilizada sobre esferas (Pierce 20341) durante 20 h a 37 °C en un tampón que contenía tampón fosfato 20 mM, pH 7, EDTA 10 mM y L-cisteína 10 mM. Tras la digestión, las esferas se retiraron empleando una columna de plástico desechable, después se retiraron los fragmentos Fc y el anticuerpo no digerido contaminante de los fragmentos Fab empleando una cromatografía de tipo proteína A (MabSelect, GE Healthcare 17-5438-03). La fracción no unida, que contenía los fragmentos Fab, se volvió a purificar empleando una cromatografía de exclusión molecular (SEC) Superdex 200pg (SEC) (GE Healthcare 17-1069-01) empleando HEPES 25 mM, pH 7,7, tampón NaCl 150 mM como fase móvil. El complejo se preparó mezclando 11,5 mg de Fab purificados (GRITS30249) con 5,75 mg de OSM recombinante (GRITS23122) a una proporción molar de 1:1 durante 1,5 h a 4 °C. El complejo después se purificó del material no complejado empleando SEC Superdex 200pg. El complejo resuelto se concentró hasta 44 mg/ml de proteínas totales (rendimiento de 9,2 mg) empleando un dispositivo de concentración centrífuga equipado con una membrana de 10 de valor de corte de peso molecular (Vivaspin VS2002). Los componentes del complejo se validaron empleando una secuenciación N-terminal, espectrometría de masas y SDS-PAGE. La actividad de unión funcional a OSM de los fragmentos Fab se confirmó empleando el ensayo de inhibición de gp130 (los datos no se muestran).

2.3.2 Cristalización del complejo 10G8-OSM

Los fragmentos Fab de 10G8 OSM se complejaron con OSM, y esto se cristalizó a 20 °C empleando PEG3500 como precipitado. La cristalización se optimizó, se envió para su análisis a the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) y se resolvió la estructura a 3,5 Å. El mAb 10G8 se une a las hélices B y C de OSM con buena complementariedad superficial y bloquean el sitio II de OSM para impedir la unión al receptor gp130 solo por impedimento estérico, sin interacción directa con ningún resto del sitio II. Los únicos restos directamente implicados en la unión (distancia menor de 5 Å), cuando se resolvieron a 3,5 Å, se ilustran en la tabla 11 y en la figura 19. La cadena ligera fue la responsable de la mayor parte de este efecto bloqueante. Cuatro CDR se unieron a las hélices B y C de OSM, CDRH2, H3 yCDRL1 y L3, directamente o a través de interacciones con mediación del agua. No se produjo una distorsión significativa en la molécula de OSM tras la unión al mAb 10G8. Puesto que dos de las CDR no eran de unión, CDRH1 y L2, se prepararon variantes del anticuerpo en los que una o ambas se revirtieron a la secuencia humana. Esto puede conducir a una molécula menos inmunogénica que el injerto humanizado directo.

Tabla 11

Restos de OSM	Resto (tipo)	Átomo	Restos de anticuerpo (L = cadena ligera, H = cadena pesada)	Resto (tipo)	Átomo	Distancia en Angstroms
A	82(LEU)	C	H	104(THR)	CG2	3,45
A	82(LEU)	O	H	104(THR)	CG2	3,47
A	83(HIS).	CA	H	59(TYR)	OH	3,20
A	83(HIS).	CB	H	59(TYR)	OH	3,37
A	83(HIS).	CE1	H	103(THR).	CG2	3,43
A	83(HIS).	NE2	H	106(TRP).	CH2	3,44
A	83(HIS).	CD2	H	59(TYR).	OH	3,30
A	83(HIS).	C	H	59(TYR).	OH	3,26
A	83(HIS).	O	H	59(TYR).	OH	2,62
A	84(ARG).	NH1	H	57(PHE).	CE1	3,47
A	90(GLN).	OE1	H	60(TYR).	O	3,30
A	90(GLN).	NE2	H	65(ARG).	NH2	3,08
A	94(LYS).	NZ	H	62(ASP).	OD2	3,38
A	115(ARG).	NE	H	104(THR).	OG1	3,19
A	115(ARG).	NH2	H	105(PHE).	CD1	3,49
A	115(ARG).	NH2	H	105(PHE).	CE1	3,25
A	115(ARG).	NH2	H	104(THR).	O	3,21
A	122(ARG).	NH2	H	103(THR).	OG1	3,14
A	152(THR).	OG1	H	58(THR).	OG1	3,19
A	112(GLN).	O	L	96(ARG).	NH2	3,08
A	115(ARG).	NH2	L	96(ARG).	O	3,30
A	123(ASN).	CG	L	34(TYR).	OH	3,18
A	123(ASN).	ND2	L	34(TYR).	OH	2,56

2.3.3

2.3.4 Anticuerpo 10G8 humanizado: Sustituciones de CDR humanas

La estructura cristalina resuelta en el laboratorio del mAb 10G8 anti-OSM complejo con OSM indicó que CDRH1 y CDRL2 no están implicadas directamente en la unión al antígeno. Se seleccionaron CDR de líneas germinales humanas para reemplazar a estas CDR de línea germinal de ratón. Se ensayaron dos secuencias CDRH1 y dos secuencias CDRL2 de línea germinal humana para determinar sus efectos sobre la unión al antígeno. Para ambas CDR de cadena pesada y ligera, se ensayaron las secuencias del marco aceptor de la línea germinal humana original (IGHV3_7 y IGKV4_1, respectivamente) y también se seleccionaron otras dos secuencias de línea germinal humana basándose en la homología del marco flanqueante y las CDR (IGHV3_23 and IGKV1_5). Las secuencias de CDRH1 y CDRL2 de la línea germinal humana se intercambiaron por las respectivas CDR de ratón en las regiones V H0 y L1 humanizadas. Las nuevas regiones V se sintetizaron *de novo* mediante la unión de oligonucleótidos solapantes y una amplificación por PCR como se indica en la sección 1.1.4.

2.4 Bioensayos de anticuerpos 10G8 humanizados: mAb H0L1 10G8 humanizado frente a mAb 10G8 humanizado con CDR de no unión humanizadas

2.4.1 Selección secundaria

Análisis BIACore:

Un análisis BIACore de los sobrenadantes de transfección procedentes de las diversas construcciones CDRH1 y CDRL2 de H0L1 10G8 humanizadas demostró que el único anticuerpo que conservaba íntegramente la afinidad por OSM humana del mAb precandidato fue la molécula H0(IGHV3_23)L1 (tabla 12). Esta construcción, junto con otras dos moléculas con los siguientes mejores valores de KD, H0L1(IGKV4_1) y H0(IGHV3_23)L1(IGK4_1), se aumentaron de escala y se purificaron para su posterior estudio.

Tabla 12: Cinética de BIACore - Cinética de unión a OSM humana y de cynomolgus de los sobrenadantes de transfección de anticuerpos variantes de CDRH1 y CDRH2 de H0L1 10G8 comparada con la quimera de 10G8

	OSM de cynomolgus			OSM humana		
	Ka (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Kd (s ⁻¹)	KD (nM)	Ka (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Kd (s ⁻¹)	KD (nM)
H0 IGHV3_7 +L1	3,37E+7	0,8146	24,2	9,10E+4	9,67	10,6
H0 IGHV3_23 +L1	3,52E+5	1,09E-4	0,310	3,61E+5	1,58E-4	0,437
H0+L1 IGKV4_1	1,50E+5	2,12E-4	1,41	1,61E+5	2,21E-4	1,37
H0+L1 IGKV1_5	6,75E+4	5,57E-4	8,26	6,87E+4	6,40E-4	9,33
H0 IGHV3_7 +L1 IGKV4_1	5,07E+4	1,77E-3	34,9	3,68E+4	1,63E-3	44,4
H0 IGHV3_7 +L1 IGKV1_5	nivel de captura bajo			nivel de captura bajo		
H0 IGHV3_23 +L1 IGKV4_1	1,52E+5	2,23E-4	1,47	1,59E+5	2,47E-4	1,56
H0 IGHV3_23 +L1 IGKV1_5	6,67E+4	5,93E-4	8,89	7,11E+4	6,60E-4	9,27
H0 +L1	3,45E+5	1,04E-4	0,301	3,32E+5	1,53E-4	0,461
H0L1 purificado	3,38E+5	1,15E-4	0,341	3,40E+5	1,51E-4	0,445

25 Ensayo de neutralización de células KB:

El ensayo de neutralización de células KB demostró que la construcción 10G8 H0(IGHV3_23)L1 humanizada

(denominada H0(CDRH1)L1) muestra una potencia muy similar al mAb de 10G8 H0L1 humanizado parental (denominado H0L1). Cualquier reversión del CDRL2 de no unión a la secuencia humana mostró una disminución en la actividad de neutralización, tal como puede observarse a partir de los datos para los anticuerpos H0L1(IGKV4_1) (denominado H0L1(huCDRL2)) y H0(IGHV3_23)L1(IGK4_1) (denominado H0(huCDRH1)L1(huCDRL2)) (figura 20, tabla 13).

5

Tabla 13: Ensayo de neutralización de células KB - Resumen de tres repeticiones de un ensayo de neutralización de células KB para clasificar la actividad de los variantes CDRH1 y CDRL2 de H0L1 10G8 humanizados frente a la OSM humana y de cynomolgus

Clasificación de OSM humana	Anticuerpo	OSM humana, CI50 promedio $\mu\text{g/ml} \pm \text{DE}$	OSM de cynomolgus, CI50 promedio $\mu\text{g/ml} \pm \text{DE}$ (clasificación OSM de cynomolgus)
1	H0(huCDRH1)L1	0,008 \pm 0,005 (53 pM)	0,007 \pm 0,000 (1) (47 pM)
2	H0L1	0,009 \pm 0,002 (60 pM)	0,007 \pm 0,002 (2) (47 pM)
3	H0L1(huCDRL2)	0,054 \pm 0,024 (360 pM)	0,081 \pm 0,004 (4) (540 pM)
4	H0(huCDRH1)L1(huCDRL2)	0,077 \pm 0,038 (513 pM)	0,114 \pm 0,045 (5) (760 pM)

10 A partir de estos datos se eligió el 10G8 H0(huCDRH1)L1 humanizado como el principal mAb precandidato para la caracterización completa.

2.5 Bioensayos de anticuerpos 10G8 humanizados: mAb 10G8 H0(IGHV3_23)L1 humanizado

2.5.1 Selección secundaria

Análisis BIACore:

15 El análisis BIACore se realizó sobre el mAb H0(IGHV3_23)L1 purificado y se clasificó frente a la quimera de 10G8 y el mAb parental 10G8 H0L1 humanizado. Existe poca o ninguna diferencia entre el mAb H0(IGHV3_23)L1 y el mAb H0L1 parental en la afinidad por OSM humana y de cynomolgus (tabla 6). El mAb H0(IGHV3_23)L1 tiene una afinidad mayor en 6,5 veces (0,8 unidades logarítmicas) por la OSM humana comparado con un anticuerpo humanizado anti-OSM no competitivo alternativo 15E10h. Se empleó un lote nuevo de OSM para este estudio, que produjo unos valores de KD menor, aunque las diferencias entre los variantes humanizados y el anticuerpo no competitivo
20 siguieron siendo las mismas.

Tabla 14: Cinética de BIACore - Cinética de unión a OSM humana y de cynomolgus del mAb H0(IGHV3_23)L1 purificado comparada con la quimera de 10G8 y comparada con el mAb parental 10G8 H0L1 humanizado y con un anticuerpo humanizado anti-OSM no competitivo alternativo 15E10h.

	OSM de cynomolgus			OSM humana		
	Ka (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Kd (s ⁻¹)	KD (nM)	Ka (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Kd (s ⁻¹)	KD (nM)
Quimera de 10G8	2,50E+05	6,63E-05	266	4,27E+05	7,87E-05	184
H0 (CDRH1 IGHV3_23) L1	4,23E+05	8,39E-05	199	7,09E+05	9,65E-05	136
H0L1	4,27E+05	8,31E-05	195	7,12E+05	8,90E-05	125
15E10h	5,07E+05	3,24E-04	640	7,36E+05	6,49E-04	882

25

Análisis Kinexa

Se empleó un ensayo de afinidad en fase de disolución Kinexa (Sapidyne Instruments 3200) para determinar la afinidad global del anticuerpo anti-OSM H0(huCDRH1)L1 y 15E10 humanizado (un anticuerpo de OSM no relacionado) por la OSM humana, de macaco cynomolgus, de macaco rhesus y de mono tití (tabla 15). Se añadió
30 15E10 humanizado para fines comparativos.

Se prepararon esferas de OSM por adsorción (esferas de poli(metacrilato de metilo)-PMMA) o acoplamiento de

amina (esferas de NHS-Sepharose activada). La gama de moléculas de OSM estudiadas necesita la generación de esferas revestidas con diferentes concentraciones de OSM. Para la porción en fase de disolución del ensayo, se incubó una concentración fijada del anticuerpo con una gama amplia de concentraciones de OSM y se dejó que se alcanzase el equilibrio mediante una incubación a temperatura ambiente durante al menos 2 h antes de comenzar con el análisis. Después las esferas de OSM se emplearon para determinar la cantidad de anticuerpo libre presente en las muestras en fase de disolución por medio de la unión del anticuerpo libre a la matriz de esferas de OSM y después se detectó empleando un anticuerpo secundario adecuado (antihumano o antirrátón, dependiendo de la construcción ensayada) marcado con un tinte fluorescente. Las curvas de unión se ajustaron empleando el programa informático de análisis Kinexa Pro inherente al aparato. Después se compilaron múltiples ejecuciones empleando concentraciones iniciales variables del anticuerpo y se analizaron empleando el programa informático de análisis de n-curvas para producir una determinación de la afinidad más precisa.

H0(huCDRH1)L1 muestra una mayor afinidad por la OSM humana, tal como había sido previamente evaluado mediante el análisis Biacore. A diferencia de Biacore, en el que el anticuerpo se une a la superficie de un chip, Kinexa emplea el ligando y anticuerpo libre en una fase fluida para evaluar la afinidad, lo cual es más parecido al estado natural.

Tabla 15: Cinética de Kinexa - Cinética de unión a OSM humana, de cynomolgus, de rhesus y de tití del anticuerpo de apoyo anti-OSM purificado H0(huCDRH1)L1 y 15E10 humanizado

Construcción	Antígeno	KD (pM)	95% alto (pM)	95% bajo (pM)
H0(huCDRH1)L1	OSM humana	38	62	22
H0(huCDRH1)L1	OSM de cynomolgus	53	82	31
H0(huCDRH1)L1	OSM de mono tití	21	31	14
H0(huCDRH1)L1	OSM de rhesus	122	161	90
15E10 humanizado	OSM humana	727	1000	499
15E10 humanizado	OSM de cynomolgus	102	157	61
15E10 humanizado	OSM de mono tití	**6100	468000	<22,5
15E10 humanizado	OSM de rhesus	102	181	52

** La afinidad es muy baja por la OSM de tití, lo cual significa que, para un experimento conducido con receptores, sería necesario más de 40 nM del anticuerpo para emplear cantidades de uM de OSM.

La conclusión global es que la unión del 15E10 humanizado a la OSM de mono tití es significativamente más baja que a la OSM humana.

ELISA de gp130 humano:

El ELISA de gp130 humano emplea un exceso de OSM (25 ng/ml), lo cual reduce su capacidad para separar los anticuerpos de alta afinidad de los anticuerpos de baja afinidad. Tras tres repeticiones del ensayo de gp130 se confirmó que el 10G8 parental de ratón, la quimera de 10G8, el 10G8 H0L1 parental humanizado (H0L1) y H0(huCDRH1)L1 eran potentes para bloquear la unión de OSM humana y de cynomolgus al receptor gp130 en este ensayo (figura 21). Debido a los altos niveles del antígeno en este ensayo, no pudo discernirse una clasificación clara.

El ensayo de gp130 humano se repitió en presencia de suero AB humano al 25% y de fluido sinovial reunido humano al 25%. Tres repeticiones de este ensayo para cada matriz demostraron que todos los anticuerpos, el 10G8 parental de ratón, la quimera de 10G8, el 10G8 H0L1 parental humanizado (H0L1) y H0(huCDRH1)L1, junto con 15E10h, conservaron su capacidad para bloquear la unión de OSM humana y de cynomolgus a gp130 (los datos no se muestran).

Ensayo de neutralización de células KB:

El ensayo de neutralización de células KB ES un ensayo más discriminante para separar los neutralizadores de alta afinidad de los neutralizadores de baja afinidad que el ensayo de gp130, debido a los bajos niveles de OSM utilizados (1 ng/ml). A partir de tres repeticiones del ensayo, (H0(huCDRH1)L1 produjo un valor promedio de IC50 de 30 ng/ml frente a la OSM humana, de 41 ng/ml frente a la OSM de cynomolgus, y de 36 ng/ml frente a la OSM de mono tití (figura 22; tabla 17).

Tabla 17: Ensayo de neutralización de células KB - Resumen de tres repeticiones de un ensayo de neutralización de células KB para clasificar la actividad de H0(huCDRH1)L1 frente a la OSM humana, de cynomolgus y de mono tí. Se añadió 15E10h para fines comparativos.

Clasificación de OSM humana	Anticuerpo	OSM humana, CI50 promedio $\mu\text{g/ml} \pm \text{DE}$	OSM de cynomolgus, CI50 promedio $\mu\text{g/ml} \pm \text{DE}$ (clasificación OSM de cynomolgus)	OSM de mono tí, IC50 promedio $\mu\text{g/ml} \pm \text{DE}$ (clasificación OSM de mono tí)
1	10G8	0,0026 \pm 0,0009 (17 pM)	0,0017 \pm 0,0006 (3) (11 pM)	0,0017 \pm 0,0003 (1) (11 pM)
2	H0L1	0,0028 \pm 0,0004 (19 pM)	0,0014 \pm 0,0003 (2) (9 pM)	0,0017 \pm 0,0008 (2) (11 pM)
3	(H0(huCDRH1)L1	0,0030 \pm 0,0015 (20 pM)	0,0041 \pm 0,0025 (4) (27 pM)	0,0036 \pm 0,0024 (3) (24 pM)
4	Quimera de 10G8	0,0052 \pm 0,0064 (35 pM)	0,0011 \pm 0,0004 (1) (7 pM)	0,0271 \pm 0,0450 (4) (181 pM)
5	15E10h	0,0391 \pm 0,0207 (261 pM)	0,0054 \pm 0,0020 (5) (36 pM)	Sin neutralización

5 En presencia de suero AB humano al 25% o de fluido sinovial reunido al 25%, (H0(huCDRH1)L1 y 15E10h conservaron su capacidad para neutralizar la OSM humana y de cynomolgus (figura 23). Se observó una disminución en la actividad en presencia del suero AB al 25% o del fluido sinovial reunido al 25%. Lo más probable es que esto sea debido a que estas matrices interfieren con la lectura de este ensayo. Se observaron unos niveles de fondo de IL-6 más altos en este ensayo que en el ensayo normal.

10 A diferencia de 15E10h, H0(huCDRH1)L1 ha demostrado neutralizar la OSM de mono tí en el ensayo de neutralización de células KB. Un panel de otros tres anticuerpos anti-OSM humana, 10D3DLE, OM4.11.17 y OM4.11.31, tampoco neutralizó la OSM de mono tí.

Ensayo de OSM y gp130 endógenos humanos:

15 El anticuerpo parental de ratón 10G8, la quimera de 10G8, el parental 10G8 H0L1 humanizado (H0L1) y H0(huCDRH1)L1, así como 15E10h, inhibieron la OSM humana endógena procedente de cuatro donantes distintos (figura 24). A partir de los resultados de estos cuatro donantes se observó muy poca diferencia entre el mAb parental H0L1 y el mAb H0(huCDRH1)L1; estos obtuvieron una clasificación más alta que el parental de ratón 10G8 y su quimera (tabla 18). H0(huCDRH1)L1 tiene una potencia aproximadamente 12 veces (1,09 unidades logarítmicas) mayor que 15E10h. La OSM nativa fue generada mediante la estimulación con GM-CSF de neutrófilos humanos sanos.

20 Tabla 18: Ensayo de OSM y gp130 endógenos humanos - Resumen de cuatro donantes de neutrófilos en el ELISA de gp130 para evaluar la actividad del 10G8 parental de ratón, 10G8 Ch, el parental 10G8 H0L1 humanizado (H0L1) y H0(huCDRH1)L1 frente a la OSM humana endógena. Se añadió 15E10h con fines comparativos. Se empleó un anticuerpo no relacionado como control negativo.

Clasificación	mAb	CI50 $\mu\text{g/ml} \pm \text{DE}$
1	H0L1	0,0058 \pm 0,0019 (39 pM)
2	H0(huCDRH1)L1	0,0062 \pm 0,0023 (41 pM)
3	10G8	0,0090 \pm 0,0020 (60 pM)
4	Quimera de 10G8	0,0091 \pm 0,0004 (61 pM)
5	15E10h	0,0760 \pm 0,0181 (507 pM)

25 Reactividad de LIF humano (ensayo de neutralización de células KB):

El LIF humano es el miembro de la familia de IL-6 más cercano a la OSM humana. Tres repeticiones del ensayo de

células KB de LIF humano demostraron que el 10G8 parental de ratón, la quimera de 10G8, el parental 10G8 H0L1 humanizado (H0L1) y H0(huCDRH1)L1 o 15E10h no neutralizaban el LIF humano. Se añadió 15E10h para fines comparativos. Un anticuerpo anti-LIF humano disponible en el mercado sí neutralizó el LIF en este ensayo (figura 25). Esto demuestra que estos anticuerpos son específicos de OSM.

5 Ensayo de hepatocitos humanos primarios:

Los hepatocitos primarios humanos son sensibles a la OSM y liberan proteínas de la fase aguda, tales como SAA y CRP, en respuesta a la estimulación con OSM. H0(huCDRH1)L1 inhibe la liberación de SAA (figura 26) y CRP (figura 27) inducida por OSM en hepatocitos de una manera dependiente de la dosis en tres donantes distintos. Se añadió 15E10 humanizado como comparación.

- 10 Se realizaron ensayos equivalentes empleando otros tipos de células humanas primarias. Estas incluyen células endoteliales de vena umbilical humanas, fibroblastos humanos, tales como sinoviocitos de pacientes con artritis reumatoide, fibroblastos de pulmón humanos procedentes de donantes sanos y pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (los datos no se muestran). Al igual que en los ensayos previos, H0(huCDRH1)L1 mostró una mejor neutralización de OSM frente a 15E10 humanizado. La diferencia en número de veces en la potencia entre H0(huCDRH1)L1 y 15E10 humanizado varía dependiendo de la línea celular y de la concentración de OSM.
- 15

2.6 Caracterización biofísica

Se realizó un perfil biofísico básico de H0(huCDRH1)L1 junto con el mAb parental 10G8 H0L1 humanizado. Los anticuerpos se sometieron a estreses ambientales, tales como:

- Temperatura, mediante una incubación durante 14 días a 4 °C o 37 °C;
- 20 - Cinco ciclos de congelación-descongelación;
- Desaminación forzada, mediante una incubación con bicarbonato de amonio al 1% a 37 °C durante 48 horas.

Ninguno de los anticuerpos mostró una pérdida en la alteración biofísica ni una pérdida en la actividad después de los estreses mencionados anteriormente.

2.6 CDRH3 variantes de anticuerpos humanizados

25 2.6.1 Construcción de CDRH3 variantes de anticuerpos humanizados

- Se realizó la sustitución de cada resto de CDRH3 (SEQ ID NO:3) por un resto aminoácido alternativo empleando la secuencia de longitud completa de la cadena pesada H0 (IGHV3_23) SEQ ID NO:75 (secuencia variable: SEQ ID NO:74) en un plásmido pTT (National Research Council Canada, con un sitio de clonación múltiple (MCS) modificado) como molécula base. Se empleó la técnica de mutagénesis específica dirigida a sitio (SDM), por la cual se diseñaron oligonucleótidos que portan la secuencia NNK (N = A/T/G/C; K = G o T) en la posición de sustitución del aminoácido. Se empleó una reacción en cadena con polimerasa (PCR) para generar nuevos plásmidos que contienen el cambio y se usó la secuenciación del ADN para identificar los clones con los cambios en los aminoácidos. De esta forma se aislaron variantes que contenían entre 10 y 17 aminoácidos diferentes en cada una de las 12 posiciones de CDRH3. Se produjeron anticuerpos variantes de CDRH3 cotransfectando vectores pTT que comprenden un variante H0 (IGHV3_23) con la cadena ligera L1 (SEQ ID NO:72) y se ensayaron los sobrenadantes para la unión.
- 30
- 35

Se generaron 164 variantes de CDRH3 y se ensayaron con los siguientes análisis (véase 2.6.2 y 2.6.3).

2.6.2 Expresión de los variantes de CDRH3 en células HEK 293 6E

- Los plásmidos pTT que codifican los variantes de CDRH3 de cadena pesada (H0 (IGHV3_23)) y la cadena ligera L1 se cotransfectaron de forma transitoria en células HEK 293 6E y se expresaron a pequeña escala para producir anticuerpos. Los anticuerpos se evaluaron directamente del sobrenadante del cultivo de tejido.
- 40

2.6.3 Análisis cinético de los sobrenadantes de cultivo de tejido del variante de CDRH3

Se realizaron los análisis cinéticos iniciales para la selección de CDRH3 en un ProteOn XPR36 (Biorad Laboratories) y se seleccionaron ciertos sobrenadantes para un análisis cinético más preciso en un BiaCore T100.

- 45 Para el análisis ProteOn, anti-IgG humana (GE Healthcare/Biacore BR-1008-39) se acopló a un chip GLM (Biorad Laboratories 176-5012) mediante acoplamiento de amina primaria. Los variantes de CDRH3 se capturaron directamente sobre esta superficie y se hizo pasar OSM humana recombinante sobre la superficie de los anticuerpos capturados a 256, 64, 16, 4 y 1 nM, con inyección de tampón solo (es decir, 0 nM) empleado para duplicar la referencia en las curvas de unión. Tras el acontecimiento de unión de OSM, las superficies de captura se regeneraron con MgCl₂ 3 M. La regeneración elimina el anticuerpo previamente capturado que ya está listo para otro ciclo de captura y análisis de la unión. Los datos después se ajustaron al modelo de 1:1 (con transporte de masas)
- 50

ES 2 681 949 T3

inherente al programa informático de análisis ProteOn. El ensayo se realizó empleando HBS-EP (Biacore/GE-Healthcare BR-1006-69) y la temperatura del análisis fue de 25 °C.

5 Se empleó un método similar para el análisis de las construcciones empleando un Biacore T100. Se acopló anti-IgG humana (GE Healthcare/Biacore BR-1008-39) a un chip CM5 (GE Healthcare/Biacore BR-1006-68) mediante acoplamiento de aminas primarias. Los anticuerpos fueron capturados sobre esta superficie y se hizo pasar OSM humana recombinante sobre la superficie de los anticuerpos capturados a 256, 64, 16, 4 y 1 nM, con inyección de tampón solo (es decir, 0 nM) empleado para duplicar la referencia en las curvas de unión. La regeneración se realizó empleado pulsos de MgCl₂ 3 M o ácido fosfórico 100 mM o empleando ambos reactivos. Los datos se ajustaron al modelo de 1:1 inherente al programa informático de análisis Biacore T100. El ensayo se realizó empleando HBS-EP
10 (Biacore/GE-Healthcare BR-1006-69) y la temperatura del análisis fue de 25 °C.

Véase la figura 33 para los resultados de los datos de unión.

Resumen de las secuencias (tabla A)

Descripción	Secuencias de aminoácidos	Secuencia del polinucleótido
CDRH1 de 10G8	SEQ ID NO:1	n/a
CDRH2 de 10G8	SEQ ID NO:2	n/a
CDRH3 de 10G8	SEQ ID NO:3	n/a
CDRL1 de 10G8	SEQ ID NO:4	n/a
CDRL2 de 10G8	SEQ ID NO:5	n/a
CDRL3 de 10G8	SEQ ID NO:6	n/a
CDRH1 de 3E3	SEQ ID NO:7	n/a
CDRH2 de 3E3	SEQ ID NO:8	n/a
CDRH3 de 3E3	SEQ ID NO:9	n/a
CDRL1 de 3E3	SEQ ID NO:10	n/a
CDRL2 de 3E3	SEQ ID NO:11	n/a
CDRL3 de 3E3	SEQ ID NO:12	n/a
CDRH1 de 2B7	SEQ ID NO:13	n/a
CDRH2 de 2B7	SEQ ID NO:14	n/a
CDRH3 de 2B7	SEQ ID NO:15	n/a
CDRL1 de 2B7	SEQ ID NO:16	n/a
CDRL2 de 2B7	SEQ ID NO:17	n/a
CDRL3 de 2B7	SEQ ID NO:18	n/a
CDRH1 de 9G2	SEQ ID NO:19	n/a
CDRH2 de 9G2	SEQ ID NO:20	n/a
CDRH3 de 9G2	SEQ ID NO:21	n/a
CDRL1 de 9G2	SEQ ID NO:22	n/a
CDRL2 de 9G2	SEQ ID NO:23	n/a
CDRL3 de 9G2	SEQ ID NO:24	n/a
Domino V _H de 10G8 (murino)	SEQ ID NO:26	SEQ ID NO:25

ES 2 681 949 T3

Domino V _L de 10G8 (murino)	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:27
Domino V _H de 3E3 (murino)	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:29
Domino V _L de 3E3 (murino)	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:31
Domino V _H de 2B7 (murino)	SEQ ID NO:34	SEQ ID NO:33
Domino V _L de 2B7 (murino)	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:35
Domino V _H de 9G2 (murino)	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:37
Domino V _L de 9G2 (murino)	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:39
Domino V _H de 10G8 (quimera)	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:41
Domino V _L de 10G8 (quimera)	SEQ ID NO:44	SEQ ID NO:43
Domino V _H de 9G2 (quimera)	SEQ ID NO:46	SEQ ID NO:45
Domino V _L de 9G2 (quimera)	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:47
Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada variable del aceptor de línea germinal humana IGHV3_7	SEQ ID NO:50	SEQ ID NO:49
Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera variable del aceptor de línea germinal humana IGKV4_1	SEQ ID NO:52	SEQ ID NO:51
V _H de 10G8 humanizado H0 (la secuencia de nucleótidos se sometió a optimización de codones con LETO)	SEQ ID NO:54	SEQ ID NO:53
V _H de 10G8 humanizado H1 (la secuencia de nucleótidos se sometió a optimización de codones con LETO)	SEQ ID NO:56	SEQ ID NO:55
V _H de 10G8 humanizado H2 (la secuencia de nucleótidos se sometió a optimización de codones con LETO)	SEQ ID NO:58	SEQ ID NO:57
V _L de 10G8 humanizado L0 (la secuencia de nucleótidos se sometió a optimización de codones con LETO)	SEQ ID NO:60	SEQ ID NO:59
V _L de 10G8 humanizado L1 (la secuencia de nucleótidos se sometió a optimización de codones con LETO)	SEQ ID NO:62	SEQ ID NO:61
V _L de 10G8 humanizado L2 (la secuencia de nucleótidos se sometió a optimización de codones con LETO)	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:63
V _L de 10G8 humanizado L3 (la secuencia de nucleótidos se sometió a optimización de codones con LETO)	SEQ ID NO:66	SEQ ID NO:65
V _L de 10G8 humanizado L4 (la secuencia de nucleótidos se sometió a optimización de codones con LETO)	SEQ ID NO:68	SEQ ID NO:67
Cadena pesada H0 madura (la secuencia de nucleótidos se sometió a optimización de codones con LETO)	SEQ ID NO:70	SEQ ID NO:69
Cadena ligera L1 madura (la secuencia de nucleótidos se sometió a optimización de codones con LETO)	SEQ ID NO:72	SEQ ID NO:71
Variante de VH humanizado H0 (CDRH1 de IGHV3_23) (la secuencia de nucleótidos se sometió a optimización de codones con LETO)	SEQ ID NO:74	SEQ ID NO:73
Cadena pesada H0 (CDRH1 de IGHV3_23) madura (la secuencia de nucleótidos se sometió a optimización de codones con LETO)	SEQ ID NO:76	SEQ ID NO:75
CDRH1 de la cadena pesada de la línea germinal humana IGHV3_23	SEQ ID NO:77	n/a
CDRL2 de la cadena ligera de la línea germinal humana IGKV1_5	SEQ ID NO:78	n/a
Cadena pesada de 15E10h	SEQ ID NO:79	n/a

Cadena ligera de 15E10h	SEQ ID NO:80	n/a
VH B3 de 15E10 humanizado	SEQ ID NO:81	n/a
VL L2 de 15E10 humanizado	SEQ ID NO:82	n/a
OSM humana	SEQ ID NO:84	SEQ ID NO:83

Listado de secuencias

- 5 **SEQ ID NO:1 CDRH1 de 10G8**
 NYAMS
- SEQ ID NO:2 CDRH2 de 10G8**
 TISDGGSTYYLDNVRG
- 10 **SEQ ID NO:3 CDRH3 de 10G8**
 DVGHTTFWYFDV
- SEQ ID NO:4 CDRL1 de 10G8**
 RASKSVSAAGYNFMH
- 15 **SEQ ID NO:5 CDRL2 de 10G8**
 YASNLES
- SEQ ID NO:6 CDRL3 de 10G8**
 LHSREFPFT
- SEQ ID NO:7 CDRH1 de 3E3**
 SYAMS
- 25 **SEQ ID NO:8 CDRH2 de 3E3**
 TISDGGSTYYFANIQG
- SEQ ID NO:9 CDRH3 de 3E3**
 DVGLTTFWYFDV
- 30 **SEQ ID NO:10 CDRL1 de 3E3**
 RASKSVSPSGYDFMH
- SEQ ID NO:11 CDRL2 de 3E3**
 YASELES
- SEQ ID NO:12 CDRL3 de 3E3**
 QHSREFPFT
- 40 **SEQ ID NO:13 CDRH1 de 2B7**
 NYAMS
- SEQ ID NO:4 CDRH2 de 2B7**
 TISDGGGYTYLDNGQG
- 45 **SEQ ID NO:15 CDRH3 de 2B7**
 DVGLTTFWYFDV
- SEQ ID NO:16 CDRL1 de 2B7**
 RASKSVSPSSYNFMH
- 50 **SEQ ID NO:17 CDRL2 de 2B7**
 YASNLES
- 55 **SEQ ID NO:18 CDRL3 de 2B7**
 QHSREFPFT

SEQ ID NO:19 CDRH1 de 9G2
 NYAMS

5 **SEQ ID NO:20 CDRH2 de 9G2**
 TISDGGSFYYLDNVKG

SEQ ID NO:21 CDRH3 de 9G2
 DVGHTTFWYFDV

10 **SEQ ID NO:22 CDRL1 de 9G2**
 RASKSVSASGYNFMH

SEQ ID NO:23 CDRL2 de 9G2
 YASNLES

15 **SEQ ID NO:24 CDRL3 de 9G2**
 QHSREFPFT

SEQ ID NO:25 Secuencia de nucleótidos de V_H de 10G8

GAAATGCAACTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTAGTGGAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCC
 TGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTCAGTAAGTATGCCATGTCTTGGGTTCCGCCAGACTCCGGAAAA
 GAGCCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTTCACCTACTATCTAGACAATGTAA
 GGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTATTTGCAAATGAGCCATTTG
 AAGTCTGACGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATGTGGGACATACTACCTTTTGGTACTT
 20 CGATGTCTGGGGCTCAGGGACCGCGGTACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:26 Secuencia de aminoácidos de V_H de 10G8

EMQLVESGEGLVPEGGSLKLSAASGFTFSNYAMSWVRQTPEKSLEWVATISDGGSFYYLDNVRG
 RFTISRDNKNNLYLQMSHLKSDDTAMYYCARDVGHTTFWYFDVWGSHTAVTVSS

25 **SEQ ID NO:27 Secuencia de nucleótidos de V_L de 10G8**

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGTTTTCTTAGTTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTC
 CTGTAGGGCCAGCAAAAGTGTGAGTGCAGCTGGCTATAATTTTCATGCACTGGTACCAACAGAAA
 CCAGGACAGCCGCCCAAAGTCTCATCAAGTATGCATCCAACCTAGAACTCTGGGGTCCCTGCCA
 GGTTGAGTGGCAGTGGGCTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGG
 ATGCTGTAACATATTACTGTCTGCACAGTAGGGAGTTTCCGTTACGTTCCGAGGGGGACCAA
 CCTGGAAATAAAA

30 **SEQ ID NO:28 Secuencia de aminoácidos de V_L de 10G8**

DIVLTQSPVFLVSLGQRATISCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKPGQPVKLIKYASNLESVGFARFS
 GSGSGTDFTLNIHPVEEEDAVTYYCLHSREFPFTFGGGTNLEIK

SEQ ID NO:29 Secuencia de nucleótidos de V_H de 3E3

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAACCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCC
 TGTGTACCCTCTGGATTCACCTTTCAGTAGTTATGCCATGTCTTGGGTTCCGCCAGACTCCGGAAAA
 GAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTTCACCTACTATTTTGCCAATATAC
 AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATACCAAGAACAACCTATACCTGCAAATGAACCATCTG
 AAGTCTGAGGACGCAGGCATGTATTACTGTGCAAGAGATGTGGGCCTTACTACGTTTTGGTATTT
 35 CGATGTCTGGGGCACAGGGACCGGTACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:30 Secuencia de aminoácidos de V_H de 3E3

EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSVPSGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVATISDGGSFYYFANIQQ
 RFTISRDNKNNLYLQMNHLKSEDAGMYCARDVGLTTFWYFDVWGTGTTVTVSS

SEQ ID NO:31 Secuencia de nucleótidos de V_L de 3E3

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAATACTATATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTC
 CTGCAGGGCCAGCAAAAGTGTGAGTCCATCTGGCTATGATTTGACTGCTGATCAACAGAAG
 CCAGGACAGCCGCCAACTCCTCATCAAGTATGCATCCGAAGTAACTCTGGGGTCCCTGGCA
 GGTTGAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTTACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAAGAAGA
 TGCTGCAACATATTTCTGTCAGCACAGTAGGGAGTTTCCGTTACGTTCCGAGGGGGGACCAAG
 CTGGAATAAAA

SEQ ID NO:32 Secuencia de aminoácidos de VL de 3E3

DIVLTQSPASLTISLGQRATISCRASKSVSPSGYDFMHWYQQKPGQPPKLLIKYASELESGVPRFSG
 SSGTDFTLNHPVEEEDAATYFCQHSREFPFTFGGGTKLEIK

5

SEQ ID NO:33 Secuencia de nucleótidos de VH de 2B7

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAACTGGAGGGTCCCTGAACTCTCC
 TGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTCAGTAACTATGCCATGTCTTGGGTTCCGAGACTCCGGAAAA
 GAGGCTGGAGTGGGTCCGACCATTAGTGATGGTGGTGGTTACACCTACTATTTAGACAATGGA
 CAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTACCTGCAGATGAGCCATC
 TGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATGTGGGACTTACTACGTTTTGGTAC
 TTCGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:34 Secuencia de aminoácidos de VH de 2B7

EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSNYAMSWVRQTPEKRLEWVATISDGGGYTYLDNGQ

10

GRFTISRDNKNNLYLQMSHLKSEDTAMYCARDVGLTTFWYFDVWGTGTTVTVSS

SEQ ID NO:35 Secuencia de nucleótidos de VL de 2B7

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGTTTCTTAGTTATATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTC
 CTGCAGGGCCAGCAAAAGTGTGAGTCCATCTAGCTATAATTTGACTGCTGATCAACAGAGAC
 CAGGACAGCCGCCAACTCCTCATCACGTATGCTTCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAG
 GTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAAGAGGAT
 GCTGCAACATATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGTTTCCGTTACGTTCCGAGGGGGGACCAAGG
 TGGAATAAAA

15

SEQ ID NO:36 Secuencia de aminoácidos de VL de 2B7

DIVLTQSPVSLVISLGQRATISCRASKSVSPSSYNFMHWYQQRPGQPPKLLITYASNLESGVPRFSG
 SSGTDFTLNHPVEEEDAATYYCQHSREFPFTFGGGTRLEIK

SEQ ID NO:37 Secuencia de nucleótidos de VH de 9G2

GAAGTACAAGTAGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGGAGCCTGGAGGGTCCCTGAACTCTCC
 TGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTCAGTAACTATGCCATGTCTTGGGTTCCGAGACTCCGGAAAA
 GAGGCTGGAGTGGGTCCGAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTTACCTACTATCTAGACAATGTAA
 AGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTATTTGCAAATGAGCCATTTG
 AAGTCTGACGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATGTGGGACATACTACGTTTTGGTACTT
 CGATGTCTGGGGCACAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

20

SEQ ID NO:38 Secuencia de aminoácidos de VH de 9G2

EVQLVESGGGLVEPGGSLKLSAASGFTFSNYAMSWVRQTPEKRLEWVATISDGGSFYLDNVKG
 RFTISRDNKNNLYLQMSHLKSDDTAMYCARDVGHHTTFWYFDVWGTGTTVTVSS

SEQ ID NO:39 Secuencia de nucleótidos de VL de 9G2

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGTTTTCTTAGTTATATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTC
 CTGCAGGGCCAGCAAAAGTGTGAGTGCATCTGGCTATAATTTGACTGCTGATCAACAGAAA
 CAGGACAGCCGCCAAAGTCTCATCAAGTATGCATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAG
 GTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGAT
 GCTGTAACATATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGTTTCCGTTACGTTCCGAGGGGGGACCAAGC
 TGGAATAAAA

25

SEQ ID NO:40 Secuencia de aminoácidos de V_L de 9G2

DIVLTQSPVFLVISLGQRATISCRASKSVSASGYNFMHWYQQKPGQPPKVLIKYASNLESGVPARFSG
SGSGDFTLNHPVEEEDAVTYQCQHSREFPFTFGGGTKLEIK

5 **SEQ ID NO:41 Secuencia de nucleótidos de V_H de la quimera de 10G8**

GAAATGCAACTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTAGTGGAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCC
TGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAACTATGCCATGTCTTGGGTTCCGCCAGACTCCGGAAAA
GAGCCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTTCACCTACTATCTAGACAATGTAA
GGGCGGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTATTTGCAAATGAGCCATTTG
AAGTCTGACGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATGTGGGACATACTACCTTTTTGGTACTT
CGATGTCTGGGGCTCAGGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGT
GTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGG
TGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCG
TGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCG
TGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCAGCAACAC
CAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCC
TGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCACAAGCCTAAGGACACCCT
GATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGA
GGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGA
GGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGATTGGCT
GAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAGAAAACC
ATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGAT
GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATC
GCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTG
GACAGCGATGGCAGCTTCTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAG
GGCAACGTGTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGAGCC
TGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO:42 Secuencia de aminoácidos de V_H de la quimera de 10G8

EMQLVESGEGLVPEPGSLKLSAASGFTFSNYAMSWVRQTPEKSLEWVATISDGGSFYTYLDNVRG
RFTISRDNKNNLYLQMSHLKSDDTAMYYCARDVGHTTFWYFDVWGSGLTVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

SEQ ID NO:43 Secuencia de nucleótidos de V_L de la quimera de 10G8

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGTTTTCTTAGTTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTC
 CTGTAGGGCCAGCAAAAGTGTCAAGTGCAGCTGGCTATAATTCATGCACTGGTACCAACAGAAA
 CCAGGACAGCCGCCAAAGTCTCATCAAGTATGCATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCA
 GGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGG
 ATGCTGTAACATATTACTGTCTGCACAGTAGGGAGTTTCCGTTACGTTCCGAGGGGGGACCAA
 CCTGAAATAAAACGTACGGTGGCCGCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCAGCGATGAGCAG
 CTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAG
 GTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCA
 GGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGA
 GAAGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAG
 CTTCAACCGGGGCGAGTGC

SEQ ID NO:44 Secuencia de aminoácidos de V_L de la quimera de 10G8

DIVLTQSPVFLVSLGQRATISCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKPGQPPLVLIKYASNLESGVPARFS
 GSGSGTDFTLNIHPVEEEDAVTYCYLHSREFPFTFGGGTNLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLKADYEEKHKVYACEVTH
 QGLSSPVTKSFNRGEC

5

SEQ ID NO:45 Secuencia de nucleótidos de V_H de la quimera de 9G2

GAAGTACAACCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGGAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCC
 TGTGCAGCCTCTGGATCACTTTTCAAGTAATATGCCATGTCTTGGGTTCCGCAACTCCGGAAAA
 GAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTGATGGTGGTAGTTTACCTACTATCTAGACAATGTAA
 AGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACAACCTGTATTTGCAATGAGCCATTTG
 AAGTCTGACGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAGATGTGGGACATACTACGTTTTTGGTACTT
 CGATGTCTGGGGCACAGGGACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCCAGCGT
 GTTCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACCCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGG
 TGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCG
 TGACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCG
 TGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAGCCAGCAACAC
 CAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCC
 TGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCAGCCTAAGGACACCCT
 GATGATCAGCAGAACCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCTGA
 GGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCCAGGGA
 GGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCCAGGATTGGCT
 GAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTATCGAGAAAACC
 ATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCAGAGAT
 GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATC
 GCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTG
 GACAGCGATGGCAGCTTCTTCCGTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAG
 GGCAACGTGTTCAAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCAGAAAGAGCC
 TGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

10

SEQ ID NO:46 Secuencia de aminoácidos de V_H de la quimera de 9G2

EVQLVESGGGLVEPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMSWVRQTPEKRLEWVATISDGGSTFTYYLDNVKG
 RFTISRDNKNNLYLQMSHLKSDDTAMYYCARDVGHHTFWYFDVWGTGLTVTVSSASTKGPSVFPL
 APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT
 QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
 VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
 PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPP
 VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:47 Secuencia de nucleótidos de VL de la quimera de 9G2

GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGTTTTCTTAGTTATATCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTC
 CTGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGTGCATCTGGCTATAATTCATGCACTGGTACCAACAGAAAC
 CAGGACAGCCGCCAAAGTCTCATCAAGTATGCATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAG
 GTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGAT
 GCTGTAACATATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGTTTTCCGTTACGTTCCGAGGGGGGACCAAGC
 TGGAAATAAAACGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGATGAGCAGCT
 GAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGT
 GCAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGG
 ACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGA
 AGCACAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCT
 TCAACCGGGGCGAGTGC

5

SEQ ID NO:48 Secuencia de aminoácidos de VL de la quimera de 9G2

DIVLTQSPVFLVISLGQRATISCRASKSVSASGYNFMHWYQQKPGQPPLIKIYASNLESGVPARFSG
 SSGSDFTLNIHPVEEEDAVTYQCQHSREFPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
 QGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:49 Secuencia de nucleótidos de VH del aceptor de línea germinal humana IGHV3_7

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC
 CTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTAGCTATTGGATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
 AAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAACATAAAGCAAGATGGAAGTGAGAAATACTATGTGGACTCTG
 TGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAACAG
 CCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGA

10

SEQ ID NO:50 Secuencia de aminoácidos de VH del aceptor de línea germinal humana IGHV3_7

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVK
 GRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

15

SEQ ID NO:51 Secuencia de nucleótidos de VL del aceptor de línea germinal humana IGKV4_1

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCCACCATCA
 ACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTATATACAGCTCCAACAATAAGAACTACTTAGCTTGGTACCAG
 CAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTACTGGGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCC
 CTGACCGATTAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGC
 TGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGTACT

20

SEQ ID NO:52 Secuencia de aminoácidos de VL del aceptor de línea germinal humana IGKV4_1

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPLIYWASTRESGVPDR
 FSGSGSDFTLTISSLQAEDVAVYYCQYYST

20

SEQ ID NO:53 Secuencia de nucleótidos de VH de 10G8 humanizado H0 con optimización de codones con LETO

GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGGCGGCCTGGTCCAGCCCGGCGGGAGCCTGAGACTCTC
 TTGCGCCGCTAGCGGCTTACCTTACGCAACTACGCCATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCCCGG
 CAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCAGCGACGGCGGCAGCTTACCTACTATCTGGACAA
 CGTGAGGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAA
 CAGCCTGAGGGCCGAGGATAACGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACGTCGGCCACACCACCTT
 CTGGTACTTCGACGTCTGGGGCAGGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

SEQ ID NO:54 Secuencia de aminoácidos de V_H de 10G8 humanizado H0

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISDGGSTFTYYLDNVR
 GRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGHHTFFWYFDVWGRGTLTVSS

5

SEQ ID NO:55 Secuencia de nucleótidos de V_H de 10G8 humanizado H1 con optimización de codones con LETO

GAGATGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGGCGGCCTGGTCCAGCCCGGCGGGAGCCTGAGACTCTC
 TTGCGCCGCTAGCGGCTTACCTTACGCAACTACGCCATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCCCGG
 CAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCAGCGACGGCGGCAGCTTACCTACTATCTGGACAA
 CGTGAGGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAA
 CAGCCTGAGGGCCGAGGATAACGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACGTCGGCCACACCACCTT
 CTGGTACTTCGACGTCTGGGGCAGGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

10

SEQ ID NO:56 Secuencia de aminoácidos de V_H de 10G8 humanizado H1

EMQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISDGGSTFTYYLDNVR
 GRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGHHTFFWYFDVWGRGTLTVSS

SEQ ID NO:57 Secuencia de nucleótidos de V_H de 10G8 humanizado H2 con optimización de codones con LETO

GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGGCGGCCTGGTCCAGCCCGGCGGGAGCCTGAGACTCTC
 TTGCGCCGCTAGCGGCTTACCTTACGCAACTACGCCATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCCCGG
 CAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCAGCGACGGCGGCAGCTTACCTACTATCTGGACAA
 CGTGAGGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAA
 CAGCCTGAGGGCCGAGGATAACGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACGTCGGCCACACCACCTT
 CTGGTACTTCGACGTCTGGGGCTCCGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

15

SEQ ID NO:58 Secuencia de aminoácidos de V_H de 10G8 humanizado H2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISDGGSTFTYYLDNVR
 GRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGHHTFFWYFDVWGSGLTVTVSS

20

SEQ ID NO:59 Secuencia de nucleótidos de V_L de 10G8 humanizado L0 con optimización de codones con LETO

GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAAAGGGCCACCATC
 AACTGCAGGGCCAGCAAGAGCGTGAGCGCTGCCGGCTACAACCTCATGCACTGGTACCAGCAG
 AAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTACGCCTCCAACCTGGAGAGCGGCGTGCCA
 GACAGGTTACGCGGATCTGGCAGCGGCACCGACTTACCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGGCC
 GAGGACGTCGCCGTGTACTACTGCCTGCACAGCAGGGAGTCCCCTTACCTTTGGCGGGCGC
 ACCAAGGTGGAGATCAAG

25

SEQ ID NO:60 Secuencia de aminoácidos de V_L de 10G8 humanizado L0

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSAAGYFMHWYQQKPGQPPKLLIYYASNLESVLPDRFS
 GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCLHSREFPFTFGGGTKVEIK

30

SEQ ID NO:61 Secuencia de nucleótidos de V_L de 10G8 humanizado L1 con optimización de codones con LETO

GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAAAGGGCCACCATC
 AACTGCAGGGCCAGCAAGAGCGTGAGCGCTGCCGGCTACAACCTTCATGCACTGGTACCAGCAG
 AAGCCCGGCCAGCCCCCAAGGTGCTGATCTACTACGCCTCCAACCTGGAGAGCGGGCGTGCCA
 GACAGGTTACAGCGGATCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGGCC
 GAGGACGTCGCCGTGACTACTGCCTGCACAGCAGGGAGTCCCCTTCACCTTTGGCGGCGGC
 ACCAAGGTGGAGATCAAG

SEQ ID NO:62 Secuencia de aminoácidos de VL de 10G8 humanizado L1

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKPGQPPKVLIIYASNLESGVPDRFS
 GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVVYCLHSREFPFTFGGGTKVEIK

5

SEQ ID NO:63 Secuencia de nucleótidos de VL de 10G8 humanizado L2 con optimización de codones con LETO

GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAAAGGGCCACCATC
 AACTGCAGGGCCAGCAAGAGCGTGAGCGCTGCCGGCTACAACCTTCATGCACTGGTACCAGCAG
 AAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTACGCCTCCAACCTGGAGAGCGGGCGTGCCA
 GACAGGTTACAGCGGATCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGGCC
 GAGGACGTCGGTGTACTACTGCCTGCACAGCAGGGAGTCCCCTTCACCTTTGGCGGCGGC
 ACCAAGGTGGAGATCAAG

10

SEQ ID NO:64 Secuencia de aminoácidos de VL de 10G8 humanizado L2

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKPGQPPKLLIYASNLESGVPDRFS
 GSGSGTDFTLTISSLQAEDVVVYCLHSREFPFTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:65 Secuencia de nucleótidos de VL de 10G8 humanizado L3 con optimización de codones con LETO

GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAAAGGGCCACCATC
 AACTGCAGGGCCAGCAAGAGCGTGAGCGCTGCCGGCTACAACCTTCATGCACTGGTACCAGCAG
 AAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTACGCCTCCAACCTGGAGAGCGGGCGTGCCA
 GACAGGTTACAGCGGATCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGGCC
 GAGGACGTCGCCGTGACTACTGCCTGCACAGCAGGGAGTCCCCTTCACCTTTGGCGGCGGC
 ACCAACGTGGAGATCAAG

15

SEQ ID NO:66 Secuencia de aminoácidos de VL de 10G8 humanizado L3

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKPGQPPKLLIYASNLESGVPDRFS
 GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVVYCLHSREFPFTFGGGTNVEIK

20

SEQ ID NO:67 Secuencia de nucleótidos de VL de 10G8 humanizado L4 con optimización de codones con LETO

GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAAAGGGCCACCATC
 AACTGCAGGGCCAGCAAGAGCGTGAGCGCTGCCGGCTACAACCTTCATGCACTGGTACCAGCAG
 AAGCCCGGCCAGCCCCCAAGGTGCTGATCTACTACGCCTCCAACCTGGAGAGCGGGCGTGCCA
 GACAGGTTACAGCGGATCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGGCC
 GAGGACGTCGGTGTACTACTGCCTGCACAGCAGGGAGTCCCCTTCACCTTTGGCGGCGGC
 ACCAACGTGGAGATCAAG

25

SEQ ID NO:68 Secuencia de aminoácidos de VL de 10G8 humanizado L4

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKPGQPPKVLIIYASNLESGVPDRFS
 GSGSGTDFTLTISSLQAEDVVVYCLHSREFPFTFGGGTNVEIK

30

SEQ ID NO:69 Secuencia de nucleótidos de cadena pesada H0 madura con optimización de codones con LETO

GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGGCGCCTGGTCCAGCCCGGCGGGAGCCTGAGACTCTC
 TTGCGCCGCTAGCGGCTTACCTTACGCAACTACGCCATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCCCGG
 CAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCAGCGACGGCGGCAGCTTACCTACTATCTGGACAA
 CGTGAGGGGCGAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAA
 CAGCCTGAGGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACGTCGGCCACACCACCTT
 CTGGTACTTTCGACGTCTGGGGCAGGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGG
 CCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGGCAGCCGCCCTGG
 GCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCCGGAACAGCGGAGCCCTGA
 CCAGCGCGTGCACACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGC
 GTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAG
 CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGC
 CCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCCAAGCCT
 AAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCAC
 GAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACC
 AAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCAC
 CAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCTA
 TCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCC
 CTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCC
 CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCC
 CCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGA
 TGGCAGCAGGGCAACGTGTTTACGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACC
 CAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCTGGCAAG

5 **SEQ ID NO:70 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada H0 madura**
 EVQLVESGGGLVQPGLSLRSLCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVATISDGGSTFYLDNVR
 GRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGHHTFWYFDVWGRGTLVTVSSASTKGPSVFP
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
 TQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
 PVLDSDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:71 Secuencia de nucleótidos de cadena ligera L1 con optimización de codones con LETO
 GACATCGTGATGACTCAGAGCCCCGATAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAAAGGGCCACCATC
 AACTGCAGGGCCAGCAAGAGCGTGAGCGCTGCCGGCTACAACCTCATGCACTGGTACCAGCAG
 AAGCCCGGCCAGCCCCCAAGGTGCTGATCTACTACGCCCTCCAACCTGGAGAGCGGGCGTGCCA
 GACAGGTTACGCGGATCTGGCAGCGGCACCGACTTACCCTGACCATCTCAAGCCTGCAGGCC
 GAGGACGTCGCCGTGTACTACTGCCTGCACAGCAGGGAGTCCCCTTACCTTTGGCGGCGGC
 ACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGAT
 GAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGTCTGCTGAACAACCTTACCCCCGGGAG
 GCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGAC
 CGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGA
 CTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGAC
 CAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC

10

SEQ ID NO:72 Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera L1 madura

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSAAGYNFMHWYQQKPGQPPKVLIIYASNLESGVPDRFS
 GSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCLHSREFPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
 VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH
 QGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:73 Secuencia de nucleótidos de V_H del variante humanizado H0 (CDRH1 de IGHV3_23) con optimización de codones con LETO

GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTCCAGCCCGGCGGGAGCCTGAGACTCTC
 TTGCGCCGCTAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCCCGG
 CAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCAGCGACGGCGGCAGCTTACCTACTATCTGGACAA
 CGTGAGGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAA
 CAGCCTGAGGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACGTCGGCCACACCACCTT
 5 CTGGTACTTCGACGTCTGGGGCAGGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGC

SEQ ID NO:74 Secuencia de aminoácidos de V_H del variante H0 (CDRH1 de IGHV3_23)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISDGGSTFYLDNVR
 GRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGHHTFWYFDVWGRGTLTVVSS

10 SEQ ID NO:75 Secuencia de nucleótidos de cadena pesada H0 madura (CDRH1 de IGHV3_23) con optimización de codones con LETO

GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTCCAGCCCGGCGGGAGCCTGAGACTCTC
 TTGCGCCGCTAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCCCGG
 CAAGGGCCTGGAGTGGGTGGCCACCATCAGCGACGGCGGCAGCTTACCTACTATCTGGACAA
 CGTGAGGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAA
 CAGCCTGAGGGCCGAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGGACGTCGGCCACACCACCTT
 CTGGTACTTCGACGTCTGGGGCAGGGGCACACTAGTGACCGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGG
 CCCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCCCTGG
 GCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCCCTGGAACAGCGGAGCCCTGA
 CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGC
 GTGGTGACCGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTGAACCACAAG
 CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTGACAAGACCCACACCTGC
 CCCCCCTGCCCTGCCCCGAGCTGCTGGGAGGCCCCAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCT
 AAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGAGCCAC
 GAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACC
 AAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCAC
 CAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCTA
 TCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCC
 CTAGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCC
 CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCC
 CCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGA
 TGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACC
 CAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCTGGCAAG

SEQ ID NO:76 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada H0 madura (CDRH1 de IGHV3_23)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVATISDGGSTFYLDNVR
GRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVGHHTTFWYFDVWGRGTLTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:77 CDRH1 de la cadena pesada de la línea germinal humana IGHV3_23
SYAMS

5

SEQ ID NO:78 CDRL2 de la cadena ligera de la línea germinal humana IGKV1_5
KASSLES

SEQ ID NO:79 Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada humanizada de 15E10:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRGGSTDYNAAFM
SRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWYFDVWGRGTLTVSSASTKGPSVFPPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
VLDSDGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

SEQ ID NO:80 Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera humanizada de 15E10:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIEDTSNLSGIPARFSGSGSGT
DYTLTISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN
NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC

15

SEQ ID NO:81 VH B3 de 15E10 humanizado

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWVAVIWRGGSTDYNAAFM
SRFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPNSNFYWYFDVWGRGTLV (TVSS)

SEQ ID NO:82 VL L2 de 15E10 humanizado

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSGSSSVSYMYWYQQKPGQAPRLLIEDTSNLSGIPARFSGSGSGT
DYTLTISNLEPEDFAVYYCQQWSSYPPTFGQGTKLEIK

20

SEQ ID NO:83 Secuencia polinucleotídica de la OSM humana

ATGGGGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTC
 CTGTTTCCAAGCATGGCGAGCATGGCGGCTATAGGCAGCTGCTCGAAAGAG
 TACCGCGTGCTCCTTGCCAGCTCCAGAAGCAGACAGATCTCATGCAGGAC
 ACCAGCAGACTCCTGGACCCCTATATACGTATCCAAGGCCTGGATGTTCT
 AAAGTGAAGAGACTGCAGGGAGCGCCCGGGGCTTCCCCAGTGAGGAG
 ACCCTGAGGGGGCTGGGCAGGCGGGGCTTCTGCAGACCCTCAATGCCACA
 CTGGGCTGCGTCTGCACAGACTGGCCGACTTAGAGCAGCGCCTCCCAAG
 GCCCAGGATTTGGAGAGGTCTGGGCTGAACATCGAGGACTTGGAGAAGCTG
 CAGATGGCGAGGCCGAACATCCTCGGGCTCAGGAACAACATCTACTGCATG
 GCCCAGCTGCTGGACAACCTCAGACACGGCTGAGCCACGAAGGCTGGCCGG
 GGGGCTCTCAGCCGCCACCCCAACCCCTGCCTCGGATGCTTTTCAGCGC
 AAGCTGGAGGGCTGCAGGTTCTGCATGGCTACCATCGCTTCATGCACTCA
 GTGGGGCGGGTCTTCAGCAAGTGGGGGAGAGCCCGAACCGGAGCCGGAGA
 CACAGCCCCACCAGGCCCTGAGGAAGGGGGTGCAGGACCAGACCCTCC
 AGGAAAGGCAAGAGACTCATGACCAGGGGACAGCTGCCCCGGTAG

SEQ ID NO:84 Secuencia de aminoácidos de la OSM humana

MGVLLTQRTL~~SL~~VLALLFSPMASMAAIGSCSKEYRVLLGQLQKQTDLMQD
 TSRLDPYIRIQGLDVPKLRHCRERPGAFPSEETLRGLGRRGFLQTLNAT
 LGCVLHRLADLEQRLPKAQLDRLSGLNIEDLEKLQMARPNILGLRN~~NI~~YCM
 AQLLDNSDTAEPKAGRGASQPPTPTPASDAFQRKLEGCRFLHGYHRFMHS
 VGRVFSKWGESPNRSRRHSPHQALRKGVRRTRPSRKGKRLMTRGQLPR.

5

Listado de secuencias

<110> Glaxo Group Limited

<120> Proteínas de unión a antígeno

<130> PB63694

10 <160> 84

<170> FastSEQ para Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

15 <213> Murina

<400> 1

Asn Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 2

<211> 17

20 <212> PRT

<213> Murina

<400> 2

Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 3

25 <211> 12

<212> PRT

<213> Murina

<400> 3

ES 2 681 949 T3

Asp Val Gly His Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Murina
 <400> 4
 Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ala Gly Tyr Asn Phe Met His
 1 5 10 15
 <210> 5
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Murina
 <400> 5
 Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 15 1 5
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Murina
 20 <400> 6
 Leu His Ser Arg Glu Phe Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 25 <213> Murina
 <400> 7
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5
 <210> 8
 <211> 17
 30 <212> PRT
 <213> Murina
 <400> 8
 Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Phe Ala Asn Ile Gln
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 9
 35 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Murina
 <400> 9
 Asp Val Gly Leu Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10
 40 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Murina
 <400> 10
 Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Pro Ser Gly Tyr Asp Phe Met His
 45 1 5 10 15
 <210> 11

ES 2 681 949 T3

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Murina

 <400> 11
 Tyr Ala Ser Glu Leu Glu Ser
 5 1 5

 <210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Murina

 10 <400> 12
 Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Phe Thr
 1 5

 <210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> Murina

 <400> 13
 Asn Tyr Ala Met Ser
 1 5

 <210> 14
 <211> 17
 20 <212> PRT
 <213> Murina

 <400> 14
 Thr Ile Ser Asp Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Gly Gln
 1 5 10 15
 Gly

 25 <210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Murina

 <400> 15
 Asp Val Gly Leu Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

 30 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Murina

 <400> 16
 Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Pro Ser Ser Tyr Asn Phe Met His
 35 1 5 10 15

 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Murina

 40 <400> 17
 Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 45 <213> Murina

 <400> 18

ES 2 681 949 T3

Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 19
 <211> 5
 <212> PRT
 5 <213> Murina
 <400> 19
 Asn Tyr Ala Met Ser
 1 5
 <210> 20
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> Murina
 <400> 20
 Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 21
 15 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Murina
 <400> 21
 Asp Val Gly His Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10
 20 <210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Murina
 <400> 22
 Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Met His
 25 1 5 10 15
 <210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Murina
 30 <400> 23
 Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Murina
 <400> 24
 Gln His Ser Arg Glu Phe Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 25
 <211> 363
 40 <212> ADN
 <213> Murino
 <400> 25

ES 2 681 949 T3

gaaatgcaac tggaggagtc tggggaagcc ttagtggagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatgcca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccgaaaaga gcctggagtg ggctcgcaacc attagtgatg gtggtagttt cacctactat 180
 ctagacaatg taaggggccc attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caacctgtat 240
 ttgcaaatga gccatttgaa gtctgacgac acagccatgt attactgtgc aagagatgtg 300
 ggacatacta ccttttgga cttcgatgac tggggctcag ggaccgcggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 26
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Murina

5

<400> 26
 Glu Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Glu Gly Leu Val Glu Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Ser Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser His Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Val Gly His Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Ser Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 27
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Murino

10

<400> 27
 gacattgtgc tgacacagtc tcctgttttc ttagttgtat ctctggggca gagggccacc 60
 atctcctgta gggccagcaa aagtgtcagt gcagctggct ataatttcac gcactggtac 120
 caacaqaaac caggacagcc gcccaaagtc ctcatcaagt atgcatccaa cctagaatct 180
 ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aggaggatgc tgtaacatat tactgtctgc acagtaggga gtttccgttc 300
 acgttcggag gggggaccaa cctggaata aaa 333

<210> 28
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Murina

15

<400> 28
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Phe Leu Val Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ala
 20 25 30
 Gly Tyr Asn Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Val Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Val Thr Tyr Tyr Cys Leu His Ser Arg
 85 90 95
 Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 29
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Murino

20

<400> 29

ES 2 681 949 T3

gaagtgcagc tggaggagtc tgggggagac ttagtgaaac ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgtac cctctggatt cactttcagt agttatgcca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccgaaaaga ggctggagtg ggctcgcaacc attagtgatg gtggtagttt cacctactat 180
 tttgccaata tacagggccg attcaccatc tccagagaca ataccaagaa caacctatac 240
 ctgcaaatga accatctgaa gtctgaggac gcaggcatgt attactgtgc aagagatgtg 300
 ggccttacta cgttttgga tttcgatgac tggggcacag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 30
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Murina

5

<400> 30
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Pro Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Phe Ala Asn Ile
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Asn Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn His Leu Lys Ser Glu Asp Ala Gly Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Val Gly Leu Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 31
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Murino

10

<400> 31
 gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc ttaactatat ctctggggca gagggccacc 60
 atctcctgca ggccagcaa aagtgtcagt ccatctggct atgatttcat gcactgggat 120
 caacagaagc caggacagcc gcccaactc ctcatcaagt atgcatccga actagaatct 180
 ggggtccctg gcaggttcag tggcagtggg tctgggacag atttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aagaagatgc tgcaacatat ttctgtcagc acagtaggga gtttccggtc 300
 acgttcggag gggggaccaa gctggaata aaa 333

<210> 32
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Murina

15

<400> 32
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Thr Ile Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Pro Ser
 20 25 30
 Gly Tyr Asp Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Leu Glu Ser Gly Val Pro Gly
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95
 Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 33
 <211> 364
 <212> ADN
 <213> Murino

20

<400> 33

ES 2 681 949 T3

gaagtgcagc tggaggagtc tgggggaggc ttagtgaaac ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatgcca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccgaaaaga gcttggagtg ggtcgcgacc attagtgatg gtgggtggtta cacctactat 180
 ttagacaatg gacagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caacctgtac 240
 ctgcagatga gccatctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagagatgtg 300
 ggacttacta cgttttggtg ccttcgatgt ctggggcaca gggaccacgg tcaccgtctc 360
 ctca 364

<210> 34
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Murina

5

<400> 34
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Gly Tyr Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Gly
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser His Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Val Gly Leu Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10 <210> 35
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Murino

<400> 35
 gacattgtgc tgacacagtc tcctgtttcc ttagttatat ctctggggca gagggccacc 60
 atctcctgca gggccagcaa aagtgtcagt ccatctagct ataatttcat gcactgggtac 120
 caacagagac caggacagcc gcccaaacctc ctcatcacgt atgcttccaa cctagaatct 180
 ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aagaggatgc tgcaacatat tactgtcagc acagtaggga gtttcggtc 300
 acgttcggag gggggaccag gctggaata aaa 333

15

<210> 36
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Murina

20 <400> 36
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Ser Leu Val Ile Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Pro Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Asn Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Thr Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95
 Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 37
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Murino

25

ES 2 681 949 T3

<400> 37
 gaagtacaac tagtggagtc tgggggaggc ttagtggagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatgccca tgtcttgggt tgcagact 120
 ccgaaaaga ggctggagtg ggctcgcaacc attagtgatg gtggtagttt cacctactat 180
 ctagacaatg taaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caacctgtat 240
 ttgcaaatga gccatttgaa gtctgacgac acagccatgt attactgtgc aagagatgtg 300
 ggacatacta cgttttggtta cttcgatgtc tggggcacag ggaccacggt caccgtctcc 360
 tca 363

<210> 38
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Murina

5

<400> 38
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser His Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Val Gly His Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

10

<210> 39
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Murino

15

<400> 39
 gacattgtgc tgacacagtc tcctgttttc ttagttatat ctctggggca gagggccacc 60
 atctcctgca gggccagcaa aagtgtcagt gcatctggct ataatttcat gcactggtag 120
 caacagaaac caggacagcc gcccaaagtc ctcatcaagt atgcatccaa cctagaatct 180
 ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aggaggatgc tgtaacatat tactgtcagc acagtaggga gtttccgttc 300
 acgttcggag gggggaccaa gctggaata aaa 333

<210> 40
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Murina

20

<400> 40
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Phe Leu Val Ile Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser
 20 25 30
 Gly Tyr Asn Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Val Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Val Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95
 Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

25

<210> 41
 <211> 1353
 <212> ADN
 <213> Chimera

ES 2 681 949 T3

<400> 41

gaaatgcaac tgggtggagtc tggggaaggc ttagtgagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatgcc a tgtcttgggt tccagagact 120
 ccgaaaaga gcctggagtg ggtcgcaacc attagtgatg gtggtagttt cacctactat 180
 ctagacaatg taaggggccc attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caacctgtat 240
 ttgcaaatga gccatthgaa gtctgacgac acagccatgt attactgtgc aagagatgtg 300
 ggacatacta ccttttggt a cttcgtatgc tggggctcag ggacactagt gaccgtgtcc 360
 agcgcacga ccaagggccc cagcgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420

ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgaacc ggtgaccgtg 480
 tcctggaaca gcggagccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgctg gctgcagagc 540
 agcggcctgt acagcctgag cagcgtgggt accgtgccca gcagcagcct gggcaccagc 600
 acctacatct gtaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660
 cccaagagct gtgacaagac ccacacctgc cccccctgcc ctgcccccca gctgctggga 720
 ggccccagcg tgttcctggt ccccccaag cctaaggaca ccctgatgat cagcagaacc 780
 cccgaggtga cctgtgtggt ggtggatgtg agccacgagg accctgaggt gaagtccaac 840
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaat gccaaagacca agcccaggga ggagcagtac 900
 aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggattg gctgaacggc 960
 aaggagtaca agtgaaggt gtccaacaag gcctgcctg cccctatcga gaaaaccatc 1020
 agcaaggcca agggccagcc cagagagccc caggtgtaca ccctgcccc tagcagagat 1080
 gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc tgcctggtga agggcttcta cccagcgcac 1140
 atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccct 1200
 gtgctggaca gcgatggcag cttcttctg tacagcaagc tgaccgtgga caagagcaga 1260
 tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgctcc gtgatgcacg aggcctgca caatcactac 1320
 acccagaaga gcctgagcct gtccctggc aag 1353

- 5 <210> 42
- <211> 451
- <212> PRT
- <213> Chimera
- <400> 42

ES 2 681 949 T3

Glu Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Glu Gly Leu Val Glu Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Ser Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser His Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Val Gly His Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Ser Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450

<210> 43
 <211> 654
 <212> ADN
 <213> Chimera

 <400> 43

5

ES 2 681 949 T3

gacattgtgc tgacacagtc tcctgttttc ttagttgtat ctctggggca gagggccacc 60
 atctcctgta gggccagcaa aagtgtcagt gcagctggct ataatttcat gcactggtac 120
 caacagaaac caggacagcc gcccaaagtc ctcatcaagt atgcatccaa cctagaatct 180
 ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aggaggatgc tgtaacatat tactgtctgc acagtaggga gtttccgttc 300
 acgttcggag gggggaccaa cctggaata aaacgtacgg tggccgccc cagcgtgttc 360
 atcttcccc ccagcgatga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgtctgctg 420
 aacaacttct acccccggga ggccaagggt cagtggaagg tggacaatgc cctgcagagc 480
 ggcaacagcc aggagagcgt gaccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 540
 agcacccctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg 600
 acccaccagg gcctgtccag ccccgtgacc aagagcttca accggggcga gtgc 654

<210> 44

<211> 218

<212> PRT

5 <213> Chimera

<400> 44

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Phe Leu Val Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ala
 20 25 30
 Gly Tyr Asn Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Val Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Val Thr Tyr Cys Leu His Ser Arg
 85 90 95
 Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

10 <210> 45

<211> 1353

<212> ADN

<213> Chimera

<400> 45

ES 2 681 949 T3

```

gaagtacaac tggtaggagtc tgggggagggc ttagtggagc ctggagggtc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatgcc aactatgcc tgtcttgggt tcgccagact 120
ccggaaaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgatg gtggtagtgt cacctactat 180
ctagacaatg taaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caacctgtat 240
ttgcaaatga gccatthgaa gtctgacgac acagccatgt attactgtgc aagagatgtg 300
ggacatacta cgtttttgta cttcgtatgc tggggcacag ggacactagt gaccgtgtcc 360
agcggcagca ccaagggccc cagcgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
ggcggcacag ccgcccctggg ctgcctgggtg aaggactact tccccgaacc ggtgaccgtg 480
tcctggaaca gcggagccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc 540
agcggcctgt acagcctgag cagcgtgggt accgtgccca gcagcagcct gggcaccag 600
acctacatct gtaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660
cccaagagct gtgacaagac ccacacctgc ccccctgcc ctgccccga gctgctggga 720
ggccccagcg tgttcctggt ccccccaag cctaaggaca ccctgatgat cagcagaacc 780
cccagagtgga cctgtgtggt ggtgagatgt agccaagagg accctgaggt gaagtcaac 840
tggtagcgtgg acggcgtgga ggtgcacaat gcccaagacca agcccaggga ggagcagtac 900
aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggattg gctgaacggc 960
aaggagtaca agtgaaggt gtccaacaag gcctgcctg cccctatcga gaaaaccatc 1020
agcaaggcca agggccagcc cagagagccc caggtgtaca ccctgcccc tagcagagat 1080
gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc tgctggtga agggcttcta ccccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccct 1200
gtgctggaca gcgatggcag cttcttctctg tacagcaagc tgaccgtgga caagagcaga 1260
tggcagcagg gcaacgtggt cagctgctcc gtgatgcacg aggcctgca caatcactac 1320
accagaaga gcctgagcct gtccccctggc aag 1353

```

<210> 46

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Chimera

<400> 46

```

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

```

ES 2 681 949 T3

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450

<210> 47
 <211> 654
 <212> ADN
 <213> Chimera

5

<400> 47
 gacattgtgc tgacacagtc tcctgttttc ttagttatat ctctggggca gagggccacc 60
 atctcctgca gggccagcaa aagtgtcagt gcatctggct ataatttcat gcactgggtac 120
 caacagaaac caggacagcc gcccaaagtc ctcatacaagt atgcatccaa cctagaatct 180
 ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat 240
 cctgtggagg aggaggatgc tgtaacatat tactgtcagc acagtaggga gtttccgttc 300
 acgttcggag gggggaccaa gctggaata aaacgtacgg tggccgccc cagcgtgttc 360
 atcttcccc ccagcgatga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgtctgctg 420
 aacaacttct acccccggga ggccaaggtg cagtggaagg tggacaatgc cctgcagagc 480
 ggcaacagcc aggagagcgt gaccgagcag gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 540
 agcaccctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg 600
 acccaccagg gcctgtccag ccccgtgacc aagagcttca accggggcga gtgc 654

<210> 48
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Chimera

10

<400> 48

ES 2 681 949 T3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Phe Leu Val Ile Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ser
 20 25 30
 Gly Tyr Asn Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Val Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Val Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95
 Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 49

<211> 294

<212> ADN

5 <213> Homo Sapiens

<400> 49

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agctattgga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaatactat 180
 gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gaga 294

<210> 50

<211> 98

10 <212> PRT

<213> Human

<400> 50

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

15 Ala Arg

<210> 51

<211> 300

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

20 <400> 51

ES 2 681 949 T3

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120
 tggtagcagc agaaccagc acagcctcct aagctgctca ttactgggc atctaccgg 180
 gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300

<210> 52
 <211> 100
 <212> PRT

5 <213> Homo Sapiens

<400> 52
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Tyr Ser Thr
 100

<210> 53
 <211> 363
 <212> ADN

10 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo Sapiens and Mus musculus

<400> 53
 gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggcggc ctggtccagc ccggcgggag cctgagactc 60
 tcttgccgct ctageggctt caccttcagc aactacgcca tgagctgggt gaggcaggcc 120
 cccggcaagg gcctggagt ggtggccacc atcagcagc gggcagctt cacctactat 180
 ctggacaacg tgaggggag gttcaccatc agcagggaca acgccaagaa cagcctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgag ggccgaggat accgctgtg actactgagc cagggacgtc 300
 ggccacacca cttcttggt cttcgacgtc tggggcaggg gcacactagt gaccgtgtcc 360
 agc 363

15 <210> 54
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

20 <220>
 <223> Homo Sapiens and Mus musculus

<400> 54
 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 Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Val Gly His Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 55

ES 2 681 949 T3

<211> 363
 <212> ADN
 <213> Artificial Sequence

<220>
 5 <223> Homo sapiens and Mus musculus

<400> 55
 gagatgcagc tgggtgaaaag cggcggcggc ctggtccagc cggcggggag cctgagactc 60
 tcttgcgccg ctagcgggctt caccttcagc aactacgccca tgagctgggt gaggcaggcc 120
 cccgcaagg gcctggagt ggtggccacc atcagcgacg gcggcagctt cacctactat 180
 ctggacaacg tgagggggcag gttcaccatc agcagggaca acgccaagaa cagcctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgag ggccgaggat accgcogtgt actactgcgc cagggacgtc 300
 ggccacacca ctttctgcta cttcgacgtc tggggcaggg gcacactagt gaccgtgtcc 360
 agc 363

<210> 56
 <211> 121

10 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens and Mus musculus

<400> 56
 Glu Met 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 Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Val Gly His Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 15 Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 57
 <211> 363
 20 <212> ADN
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo Sapiens and Mus musculus

<400> 57
 gaggtgcagc tgggtgaaaag cggcggcggc ctggtccagc cggcggggag cctgagactc 60
 tcttgcgccg ctagcgggctt caccttcagc aactacgccca tgagctgggt gaggcaggcc 120
 cccgcaagg gcctggagt ggtggccacc atcagcgacg gcggcagctt cacctactat 180
 ctggacaacg tgagggggcag gttcaccatc agcagggaca acgccaagaa cagcctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgag ggccgaggat accgcogtgt actactgcgc cagggacgtc 300
 ggccacacca ctttctgcta cttcgacgtc tggggctccg gcacactagt gaccgtgtcc 360
 25 agc 363

<210> 58
 <211> 121

30 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens and Mus musculus

<400> 58

ES 2 681 949 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 Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Val Gly His Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Ser Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 59

<211> 333

<212> ADN

5 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens and Mus musculus

<400> 59

gacatcgtga tgactcagag ccccgatagc ctggccgtga gcctgggcca aagggccacc 60
 atcaactgca gggccagcaa gagcgtgagc gctgccggct acaacttcat gcactgggtac 120
 cagcagaagc ccggccagcc ccccaagctg ctgatctact acgcctccaa cctggagagc 180
 ggcgtgccag acaggttcag cggatctggc agcggcaccg acttcaccct gaccatctca 240
 agcctgcagg ccgaggacgt cgccgtgtac tactgcctgc acagcagggga gttccccttc 300
 acctttggcg gcggcaccaa ggtggagatc aag 333

10 <210> 60

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

15 <223> Homo sapiens and Mus musculus

<400> 60

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

<210> 61

<211> 333

20 <212> ADN

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens and Mus musculus

<400> 61

ES 2 681 949 T3

gacatcgtga tgactcagag ccccgatagc ctggccgtga gcctgggcga aagggccacc 60
 atcaactgca gggccagcaa gagcgtgagc gctgcccggct acaacttcat gcactggtac 120
 cagcagaagc cgggccagcc ccccaagctg ctgatctact acgcctccaa cctggagagc 180
 ggcgtgccag acaggttcag cggatctggc agcggcaccg acttcaccct gaccatctca 240
 agcctgcagg ccgaggacgt cgcctgttac tactgcctgc acagcagga gttccccttc 300
 acctttggcg gcggcaccaa ggtggagatc aag 333

<210> 62

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens and Mus musculus

<400> 62

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

<210> 63

<211> 333

<212> ADN

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens and Mus musculus

<400> 63

gacatcgtga tgactcagag ccccgatagc ctggccgtga gcctgggcga aagggccacc 60
 atcaactgca gggccagcaa gagcgtgagc gctgcccggct acaacttcat gcactggtac 120
 cagcagaagc cgggccagcc ccccaagctg ctgatctact acgcctccaa cctggagagc 180
 ggcgtgccag acaggttcag cggatctggc agcggcaccg acttcaccct gaccatctca 240
 agcctgcagg ccgaggacgt cgtggtgtac tactgcctgc acagcagga gttccccttc 300
 20 acctttggcg gcggcaccaa ggtggagatc aag 333

<210> 64

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

25 <220>

<223> Homo sapiens and Mus musculus

<400> 64

ES 2 681 949 T3

```

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

```

<210> 65
 <211> 333
 <212> ADN

5 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens and Mus musculus

```

<400> 65
gacatcgtga tgactcagag ccccgatagc ctggcctgga gcctgggcga aaggccacc 60
atcaactgca gggccagcaa gagcgtgagc gctgcccggct acaacttcat gcactggtac 120
cagcagaagc ccggccagcc cccaagctg ctgatctact acgcctcaa cctggagagc 180
ggcgtgccag acaggttcag cggatctggc agcggcaccg acttcaccct gaccatctca 240
agcctgcagg ccgaggacgt cgtggtgtac tactgcctgc acagcagga gttccccttc 300
acctttggcg gcggcaccaa cgtggagatc aag 333

```

10 <210> 66
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

15 <220>
 <223> Homo sapiens and Mus musculus

```

<400> 66
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ala
 20           25           30
Gly Tyr Asn Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35           40           45
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50           55           60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65           70           75           80
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu His Ser Arg
 85           90           95
Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Val Glu Ile Lys
 100           105           110

```

<210> 67
 <211> 333
 <212> ADN

20 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens and Mus musculus

```

<400> 67
gacatcgtga tgactcagag ccccgatagc ctggcctgga gcctgggcga aaggccacc 60
atcaactgca gggccagcaa gagcgtgagc gctgcccggct acaacttcat gcactggtac 120
cagcagaagc ccggccagcc cccaaggtg ctgatctact acgcctcaa cctggagagc 180
ggcgtgccag acaggttcag cggatctggc agcggcaccg acttcaccct gaccatctca 240
agcctgcagg ccgaggacgt cgtggtgtac tactgcctgc acagcagga gttccccttc 300
acctttggcg gcggcaccaa cgtggagatc aag 333

```

25

ES 2 681 949 T3

<210> 68
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

5 <220>
 <223> Homo sapiens and Mus musculus

<400> 68
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ala
 20 25 30
 Gly Tyr Asn Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Val Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Val Val Tyr Tyr Cys Leu His Ser Arg
 85 90 95
 Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Val Glu Ile Lys
 100 105 110

10 <210> 69
 <211> 1353
 <212> ADN
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens and Mus musculus

15 <400> 69
 gaggtgcagc tgggtgaaag cggcgccggc ctggtccagc cggcggggag cctgagactc 60
 tcttgccgcg cttagcggctt caccttcagc aactacgcca tgagctgggt gaggcaggcc 120
 cccggcaagg gcctggagtg ggtggccacc atcagcgacg gcggcagctt cacctactat 180
 ctggacaacg tgagggggcag gttcaccatc agcagggaca acgccaagaa cagcctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgag ggccgaggat accgccgtgt actactgagc cagggacgtc 300
 ggccacacca ccttctggtt cttcgcagtc tggggcaggg gcacactagt gaccgtgtcc 360
 agcggccagca ccaagggccc cagcgtgttc ccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
 ggcggcacag cgcctctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgaacc ggtgaccgtg 480
 tcctggaaca gcggagccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc 540
 agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg accgtgccca gcagcagcct gggcaccag 600
 acctacatct gtaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660
 cccaagagct gtgacaagac ccacacctgc cccccctgcc ctgccccga gctgctggga 720
 ggccccagcg tgttcctggt ccccccaag cctaaggaca ccctgatgat cagcagaacc 780
 cccgaggtga cctgtgtggt ggtgatgtg agccacgagg accctgaggt gaagttcaac 840
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaat gccaagacca agcccaggga ggagcagtag 900
 aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggattg gctgaacggc 960
 aaggagtaca agtgaaggt gtccaacaag gccctgcctg cccctatcga gaaaaccatc 1020
 agcaaggcca agggccagcc cagagagccc caggtgtaca ccctgcccc tagcagagat 1080
 gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc tgctggtga agggcttcta ccccagcgac 1140
 atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccct 1200
 gtgctggaca gcgatggcag cttcttctctg tacagcaagc tgaccgtgga caagagcaga 1260
 tggcagcagg gcaacgtggt cagctgctcc gtgatgcacg aggcctgca caatcactac 1320
 acccagaaga gcctgagcct gtcccctggc aag 1353

20 <210> 70
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens and Mus musculus

<400> 70

ES 2 681 949 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 Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Val Gly His Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450

5 <210> 71
 <211> 654
 <212> ADN
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens and Mus musculus

10 <400> 71

ES 2 681 949 T3

gacatcgtga tgactcagag ccccgatagc ctggccgtga gcctgggcca aagggccacc 60
 atcaactgca gggccagcaa gagcgtgagc gctgcccggct acaacttcat gcactggtac 120
 cagcagaagc ccggccagcc ccccaagggtg ctgatctact acgcctccaa cctggagagc 180
 ggcgtgccag acaggttcag cggatctggc agcggcaccg acttcaccct gaccatctca 240
 agcctgcagg ccgaggacgt cgccgtgtac tactgcctgc acagcagga gttccccttc 300
 acctttggcg gcggcaccaa ggtggagatc aagcgtacgg tggccgcccc cagcgtgttc 360
 atcttcccc ccagcgatga gcagctgaag agcggcaccg ccagcgtggt gtgtctgctg 420
 aacaacttct acccccggga ggccaagggtg cagtggaagg tggacaatgc cctgcagagc 480
 ggcaacagcc aggagagcgt gaccgagcac gacagcaagg actccaccta cagcctgagc 540
 agcacctga ccctgagcaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc ctgtgaggtg 600
 acccaccagg gcctgtccag ccccgtgacc aagagcttca accggggcca gtgc 654

<210> 72

<211> 218

<212> PRT

5 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens and Mus musculus

<400> 72

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Ala Ala
 20 25 30
 Gly Tyr Asn Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Val Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu His Ser Arg
 85 90 95
 Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

10 <210> 73

<211> 360

<212> ADN

<213> Artificial Sequence

<220>

15 <223> Homo sapiens and Mus musculus

<400> 73

gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggcggc ctggtccagc ccggcgggag cctgagactc 60
 tcttgccg ccgctgagc cacttcagc tacgccatga gctgggtgag gcaggcccc 120
 ggcaagggcc tggagtgggt ggccaccatc agcagcggcg gcagcttcac ctactatctg 180
 gacaacgtga ggggcagggt caccatcagc agggacaacg ccaagaacag cctgtacctg 240
 cagatgaaca gcctgagggc cgaggatacc gccgtgtact actgcgccag ggacgtcggc 300
 cacaccacct tctggtactt cgacgtctgg ggcaggggca cactagtgc cgtgtccagc 360

<210> 74

<211> 121

20 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

ES 2 681 949 T3

<220>

<223> Homo sapiens and Mus musculus

<400> 74

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

<210> 75

<211> 1353

<212> ADN

10

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens and Mus musculus

<400> 75

```
gagggtgcagc tgggtgaaag cggcgggcggc ctggtccagc cggcggggag cctgagactc 60
tcttgcgccg ctagcggcct caccttcagc agctacgcca tgagctgggt gaggcaggcc 120
cccggcaagg gcctggagt ggtggccacc atcagcgacg gcggcagctt cacctactat 180
ctggacaacg tgaggggagc gttcaccatc agcagggaca acgccaagaa cagcctgtac 240
ctgcagatga acagcctgag ggccgaggat accgccgtgt actactgcgc cagggacgtc 300
ggccacacca ccttctggtt cttcgacgtc tggggcaggg gcacactagt gaccgtgtcc 360
agcgcacgca ccaagggccc cagcgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
ggcggcacag ccgccctggg ctgcctggtg aaggactact tccccgaacc ggtgaccgtg 480
tcctggaaca gcggagccct gaccagcggc gtgcacacct tccccgccgt gctgcagagc 540
agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtg accgtgccca gcagcagcct gggcaccagc 600
acctacatct gtaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660
cccaagagct gtgacaagac ccacacctgc cccccctgcc ctgcccccca gctgctggga 720
ggccccagcg tgttcctggt ccccccaag cctaaggaca ccctgatgat cagcagaacc 780
cccaggtga cctgtgtggt ggtggatgtg agccaagagg accctgaggt gaagtcaac 840
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaat gcccaagaca agcccaggga ggagcagtac 900
aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggattg gctgaacggc 960
aaggagtaca agtghtaagt gtccaacaag gcctgcctg cccctatcga gaaaaccatc 1020
agcaaggcca agggccagcc cagagagccc caggtgtaca ccctgcccc tagcagagat 1080
gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc tgctgtgga agggcttcta ccccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cccgagaaca actacaagac cccccccct 1200
gtgctggaca gcgatggcag cttcttctctg tacagcaagc tgaccgtgga caagagcaga 1260
tggcagcagc gcaacgtgtt cagctgtctc gtgatgcacg aggcctgca caatcactac 1320
accagaaga gcctgagcct gtccccctggc aag 1353
```

15

<210> 76

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Homo sapiens and Mus musculus

<400> 76

```
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 Thr Phe Ser Ser Tyr
      20           25           30
```

ES 2 681 949 T3

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Asp Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Leu Asp Asn Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Val Gly His Thr Thr Phe Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Lys
 450

<210> 77

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 77

Ser Tyr Ala Met Ser

1

5

10 <210> 78

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Lys Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5

<210> 79

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Homo sapiens and Mus musculus

<400> 79

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
 50 55 60
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys 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
 Lys Ser Pro Asn Ser Asn Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Thr Ala Ala
 130 135 140
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly Lys
 450

10

<210> 80
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

5 <220>
 <223> Homo sapiens and Mus musculus

<400> 80
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Glu
 35 40 45
 Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

10 <210> 81
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens and Mus musculus

15 <400> 81
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
 50 55 60
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys 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
 Lys Ser Pro Asn Ser Asn Phe Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Arg
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20 <210> 82
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Homo sapiens and Mus musculus

ES 2 681 949 T3

<400> 82

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

<210> 83

<211> 759

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 83

atgggggtac tgctcacaca gaggacgctg ctcagtctgg tccttgact cctgtttcca 60
 agcatggcga gcatggcggc tataggcagc tgctcgaaag agtaccgctg gctccttggc 120
 cagctccaga agcagacaga tctcatgcag gacaccagca gactcctgga cccctatata 180
 cgtatccaag gcctggatgt tcttaactg agagagcact gcagggagcg ccccggggcc 240
 ttcccagtg aggagaccct gagggggctg ggcaggcggg gcttcctgca gaccctcaat 300
 gccacactgg gctgcgtcct gcacagactg gccgacttag agcagcgcct ccccaaggcc 360
 caggatttgg agaggtctgg gctgaacatc gaggacttgg agaagctgca gatggcgagg 420
 ccgaacatcc tcgggctcag gaacaacatc tactgcatgg cccagctgct ggacaactca 480
 gacacggctg agcccacgaa ggctggccgg ggggcctctc agccgcccac ccccaccct 540
 gcctcggatg cttttcagcg caagctggag ggctgcaggt tcctgcatgg ctaccatcgc 600

ttcatgcact cagtggggcg ggtcttcagc aagtgggggg agagcccgaa cggagccgg 660
 agacacagcc cccaccagc cctgaggaag ggggtgcgca ggaccagacc ctccaggaaa 720
 10 ggcaagagac tcatgaccag gggacagctg ccccgtag 759

<210> 84

<211> 252

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 84

ES 2 681 949 T3

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Ala Ile Gly Ser Cys Ser
 20 25 30
 Lys Glu Tyr Arg Val Leu Leu Gly Gln Leu Gln Lys Gln Thr Asp Leu
 35 40 45
 Met Gln Asp Thr Ser Arg Leu Leu Asp Pro Tyr Ile Arg Ile Gln Gly
 50 55 60
 Leu Asp Val Pro Lys Leu Arg Glu His Cys Arg Glu Arg Pro Gly Ala
 65 70 75 80
 Phe Pro Ser Glu Glu Thr Leu Arg Gly Leu Gly Arg Arg Gly Phe Leu
 85 90 95
 Gln Thr Leu Asn Ala Thr Leu Gly Cys Val Leu His Arg Leu Ala Asp
 100 105 110
 Leu Glu Gln Arg Leu Pro Lys Ala Gln Asp Leu Glu Arg Ser Gly Leu
 115 120 125
 Asn Ile Glu Asp Leu Glu Lys Leu Gln Met Ala Arg Pro Asn Ile Leu
 130 135 140
 Gly Leu Arg Asn Asn Ile Tyr Cys Met Ala Gln Leu Leu Asp Asn Ser
 145 150 155 160
 Asp Thr Ala Glu Pro Thr Lys Ala Gly Arg Gly Ala Ser Gln Pro Pro
 165 170 175
 Thr Pro Thr Pro Ala Ser Asp Ala Phe Gln Arg Lys Leu Glu Gly Cys
 180 185 190
 Arg Phe Leu His Gly Tyr His Arg Phe Met His Ser Val Gly Arg Val
 195 200 205
 Phe Ser Lys Trp Gly Glu Ser Pro Asn Arg Ser Arg Arg His Ser Pro
 210 215 220
 His Gln Ala Leu Arg Lys Gly Val Arg Arg Thr Arg Pro Ser Arg Lys
 225 230 235 240
 Gly Lys Arg Leu Met Thr Arg Gly Gln Leu Pro Arg
 245 250

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un anticuerpo que se une específicamente a OSM y que inhibe la unión de OSM al receptor gp130, pero que no interactúa directamente con los restos del sitio II, y en el que el anticuerpo comprende CDRH3 de SEQ ID NO:3 o un variante de SEQ ID NO:3 en el que la posición 98 está sustituida por Leu, y en el que el anticuerpo comprende:
- i) CDRH2, tal como se indica en SEQ ID NO:2,
 - ii) CDRL1, tal como se indica en SEQ ID NO:4, y
 - iii) CDRL3, tal como se indica en SEQ ID NO:6,
- 10 y en el que el anticuerpo se une a OSM humana y de mono tití con una afinidad mayor que 1 nM cuando se mide mediante Biacore o Kinexa.
- 2.- Un anticuerpo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo no se une directamente a ninguno de los restos Q20, G120, Q16, N124.
- 3.- Un anticuerpo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que interactúa con uno o más de los restos 82, 83, 84, 90, 94, 112, 115, 122, 123, 152 de la OSM humana.
- 15 4.- Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo comprende además:
- i) CDRH1, tal como se indica en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:77, y
 - ii) CDRL2, tal como se indica en SEQ ID NO:5 o SEQ IN NO:78.
- 5.- Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo no interactúa directamente a través de CDRH1 o CDRL2 con OSM.
- 20 6.- Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además una región variable de cadena pesada codificada por SEQ ID NO:73, y una región variable de cadena ligera codificada por SEQ ID NO:61.
- 7.- Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:74, y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:62.
- 25 8.- Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además una región de cadena pesada de SEQ ID NO:76, y una región de cadena ligera de SEQ ID NO:72.
- 9.- Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
- 10.- Un anticuerpo según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo es IgG1.
- 30 11.- Un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, cuando está unido a OSM, el cocristal comprende una celda unidad con unas dimensiones de aproximadamente $a = 168,525 \text{ \AA}$, $b = 81,614 \text{ \AA}$, $c = 55,540 \text{ \AA}$, y $\beta = 106,60$ grados.
- 35 12.- Una célula hospedante recombinante transformada, transfectada o transducida que comprende al menos un módulo de expresión, en la que dicho módulo de expresión comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada de un anticuerpo según la reivindicación 8 y que comprende además un polinucleótido que codifica una cadena ligera de un anticuerpo según la reivindicación 8.
- 13.- La célula hospedante según la reivindicación 12, en la que la célula es de mamífero.
- 14.- La célula hospedante según la reivindicación 13, en la que la célula es CHO o NSO.
- 15.- Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según cualquier reivindicación anterior y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 16.- La composición farmacéutica según la reivindicación 15 para su uso en el tratamiento de un paciente humano que padece una enfermedad o un trastorno inflamatorio.
- 17.- La composición farmacéutica de la reivindicación 16 para su uso en el tratamiento de un paciente humano que padece una artropatía inflamatoria, artritis reumatoide, osteoartritis, fibrosis pulmonar idiopática (IPF), esclerosis sistémica, síndrome de Sjogren, escleroderma y/o psoriasis.

Figura 1: ELISA de gp130 humano

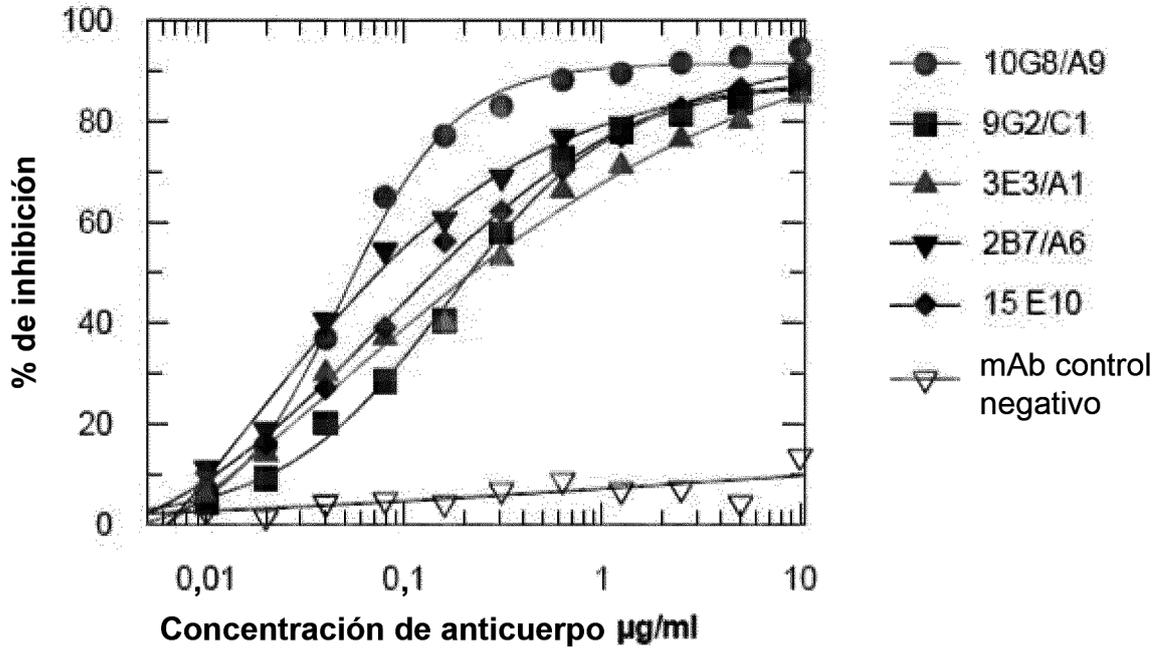


Figura 2: Ensayo de células KB

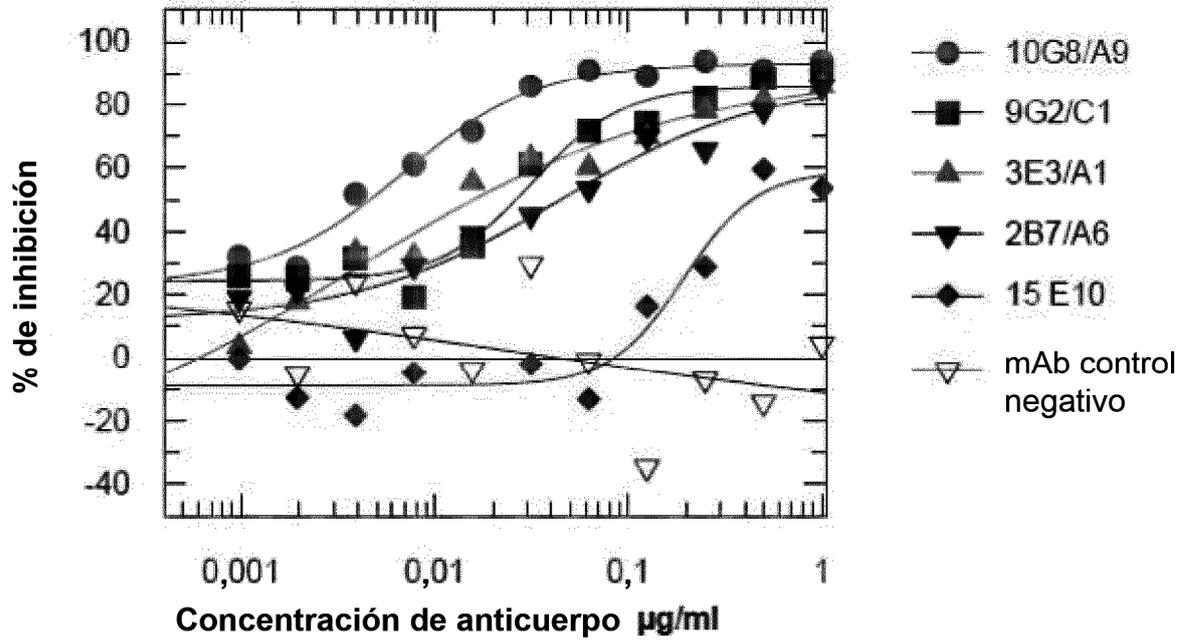


Figura 3: Ensayo de células KB

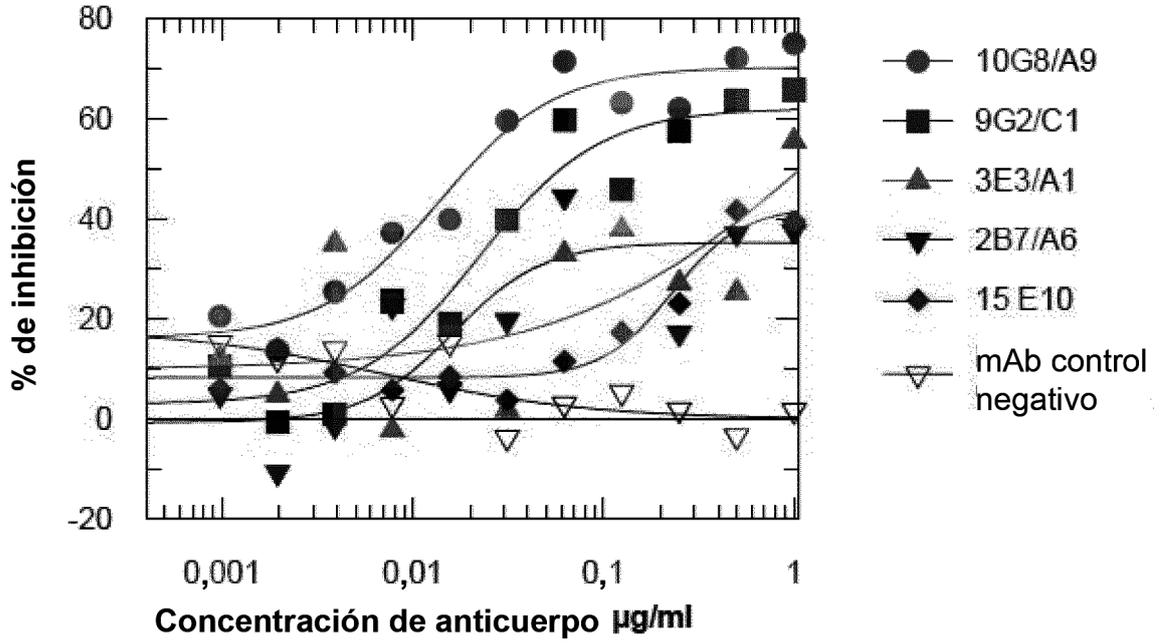


Figura 4: Ensayo de OMS y gp130 humanos endógenos

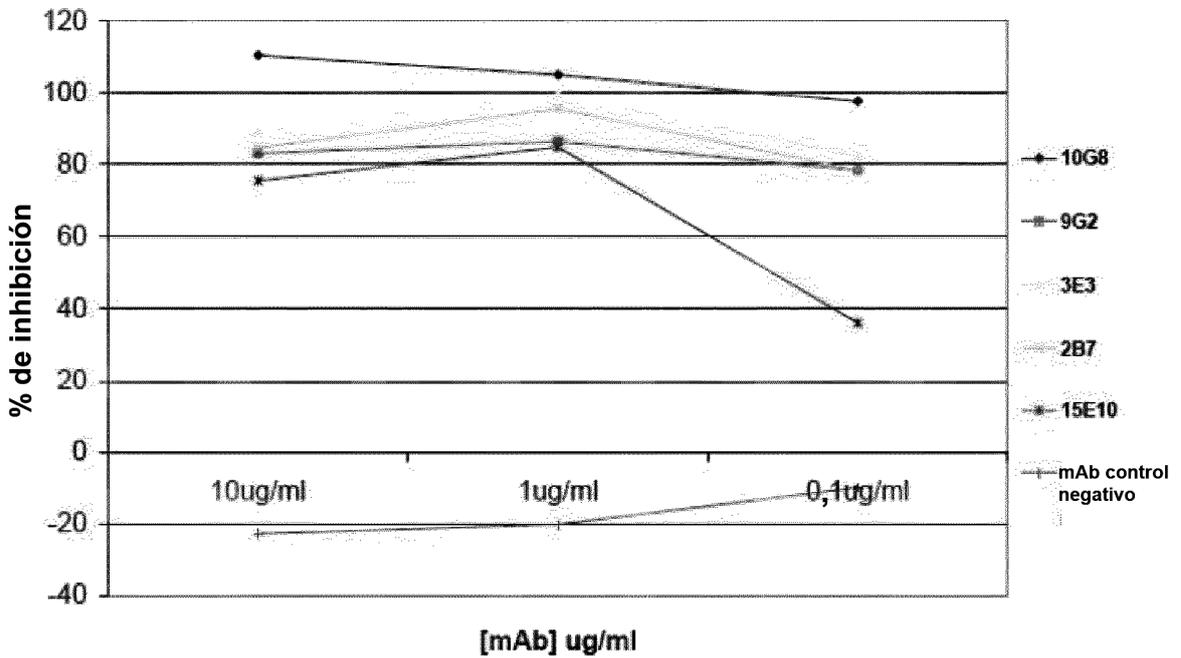


Figura 5: Ensayo de células KB

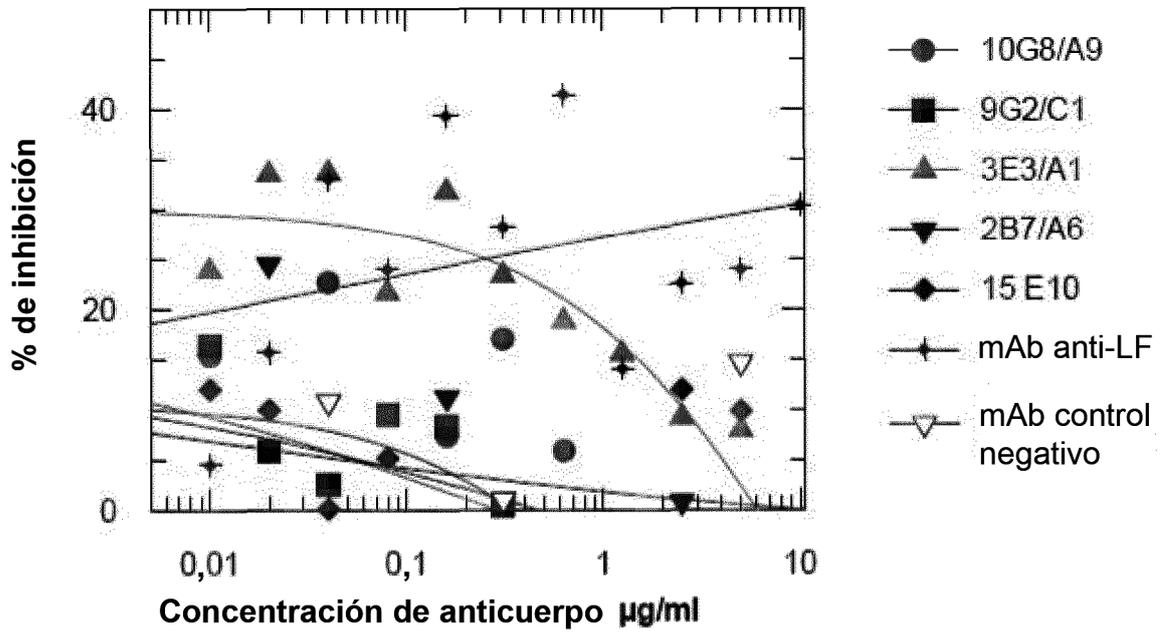


Figura 6: Ensayo de células KB

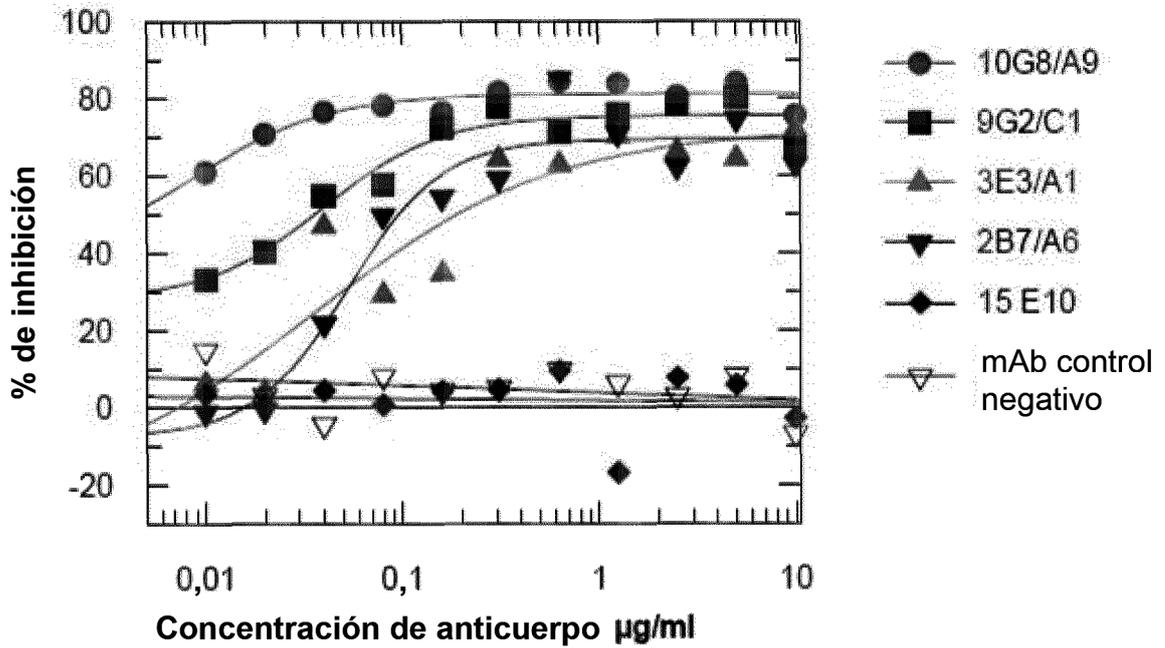
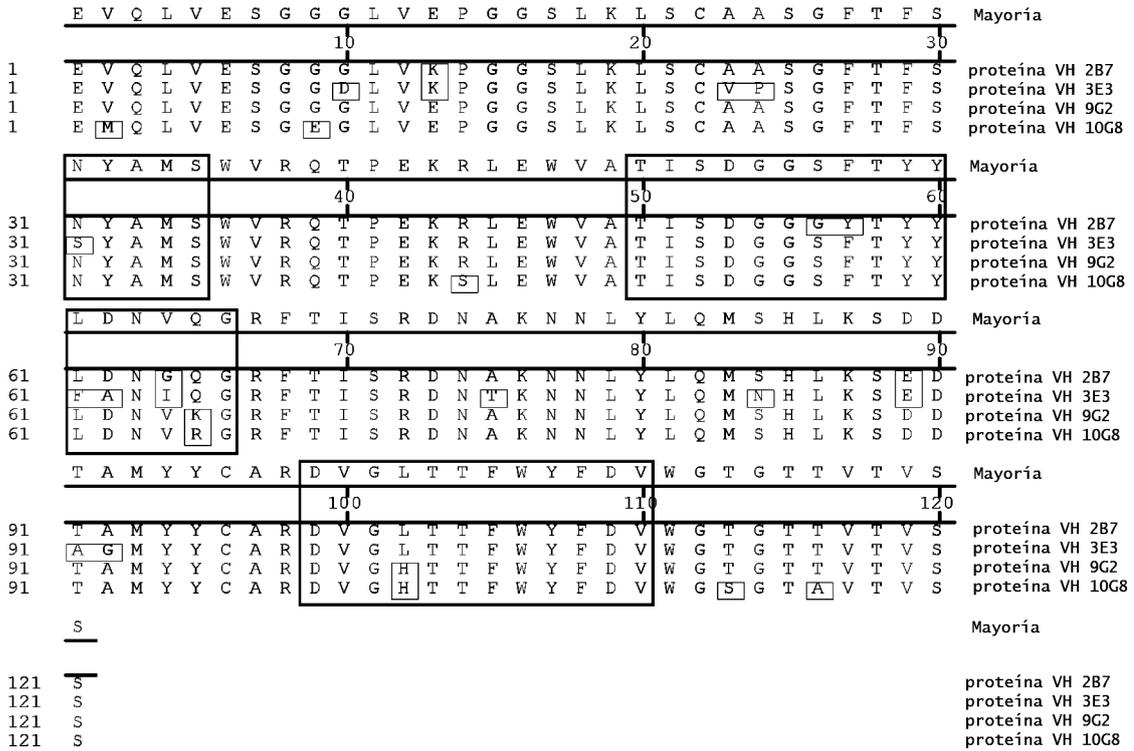
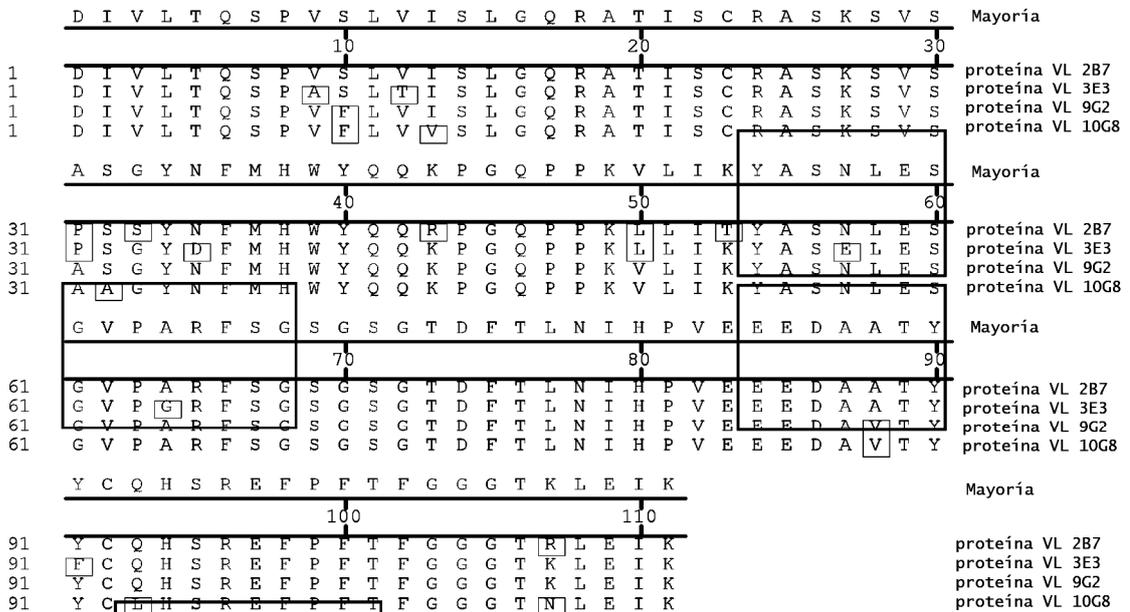


Figura 7



Decoración "Decoración n.º 1": Restos de la caja que se diferencian del consenso.

Figura 8



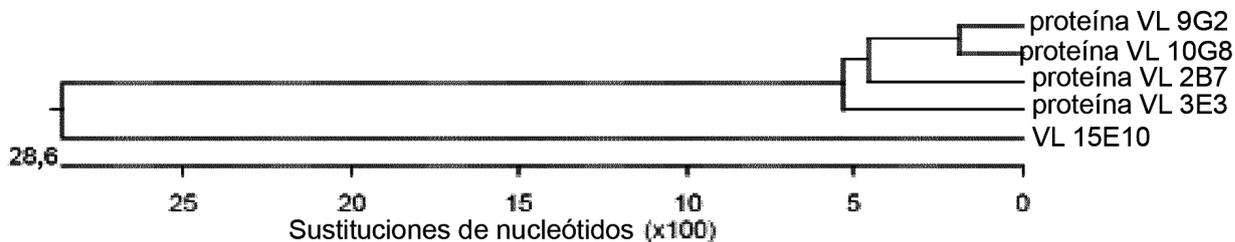
Decoración "Decoración n.º 2": Restos de la caja que se diferencian del consenso.

Figura 9

Árbol filogenético de apoyos de VH frente a VL 15E10.meg ClustalW(lento/preciso, Gonnet)

Página

10 diciembre 2007 17:24



Distancias de pares de secuencias de apoyos de VH frente a VL 15E10.meg ClustalW (lento/preciso, Gonnet)

10 diciembre 2007 17:23

Porcentaje de identidad

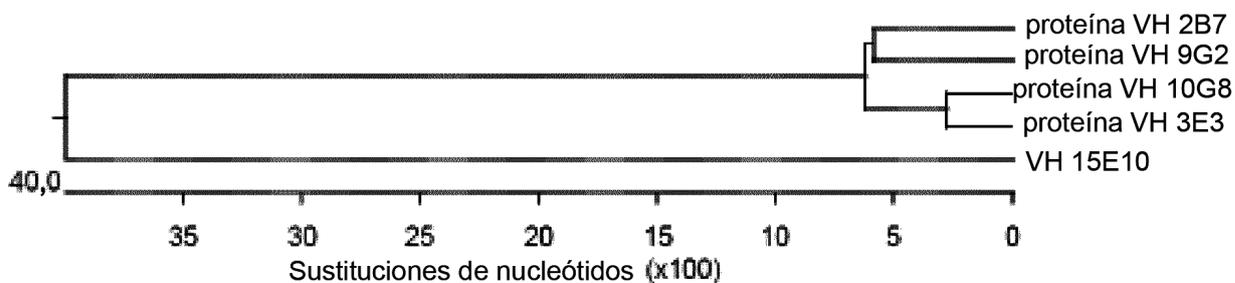
	1	2	3	4	5	
Divergencia	1	59,4	58,5	59,4	57,5	1
	2	55,8	91,0	92,8	90,1	2
	3	57,7	9,6	91,0	87,4	3
	4	55,8	7,6	9,6	96,4	4
	5	59,7	10,7	13,8	3,7	5
	1	2	3	4	5	

VL 15E10
proteína VL 2B7
proteína VL 3E3
proteína VL 9G2
proteína VL 10G8

Figura 10

Árbol filogenético de apoyos de VH frente a VL 15E10.meg ClustalW (lento/preciso, Gonnet)

10 diciembre 2007 17:16



Distancias de pares de secuencias de apoyos de VH frente a VL 15E10.meg ClustalW (lento/preciso, Gonnet)

10 diciembre 2007 17:16

Porcentaje de identidad

	1	2	3	4	5	
Divergencia	1	49,2	48,3	50,8	48,3	1
	2	79,9	89,3	94,2	90,1	2
	3	82,1	11,6	87,6	83,5	3
	4	75,5	6,0	13,6	95,0	4
	5	82,1	10,7	18,7	5,1	5
	1	2	3	4	5	

VH 15E10
proteína VH 2B7
proteína VH 3E3
proteína VH 9G2
proteína VH 10G8

Figura 11: ELISA de unión a OSM directo

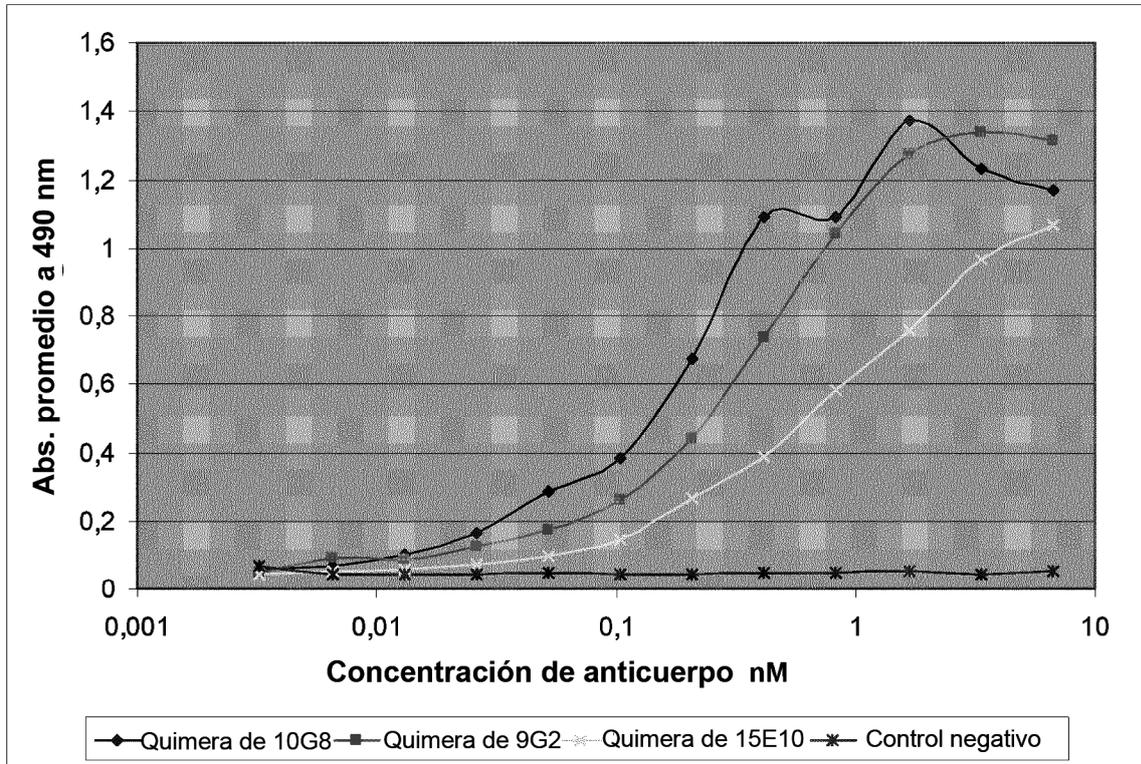


Figura 12: ELISA de gp130 humano

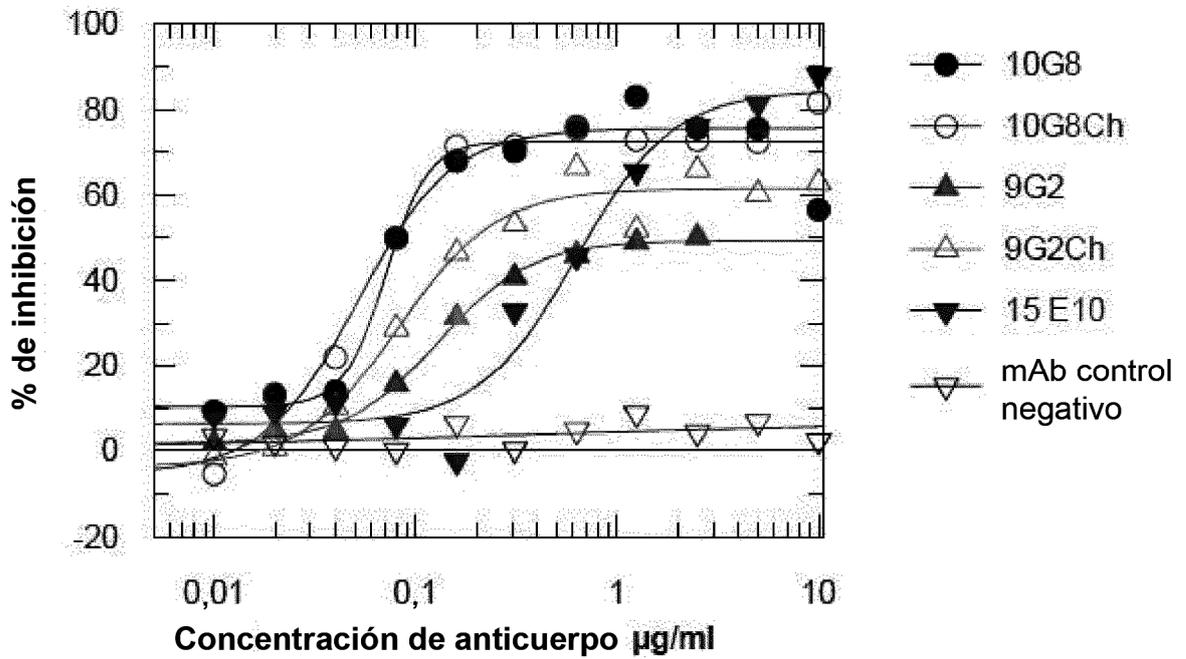


Figura 13: Ensayo de células KB

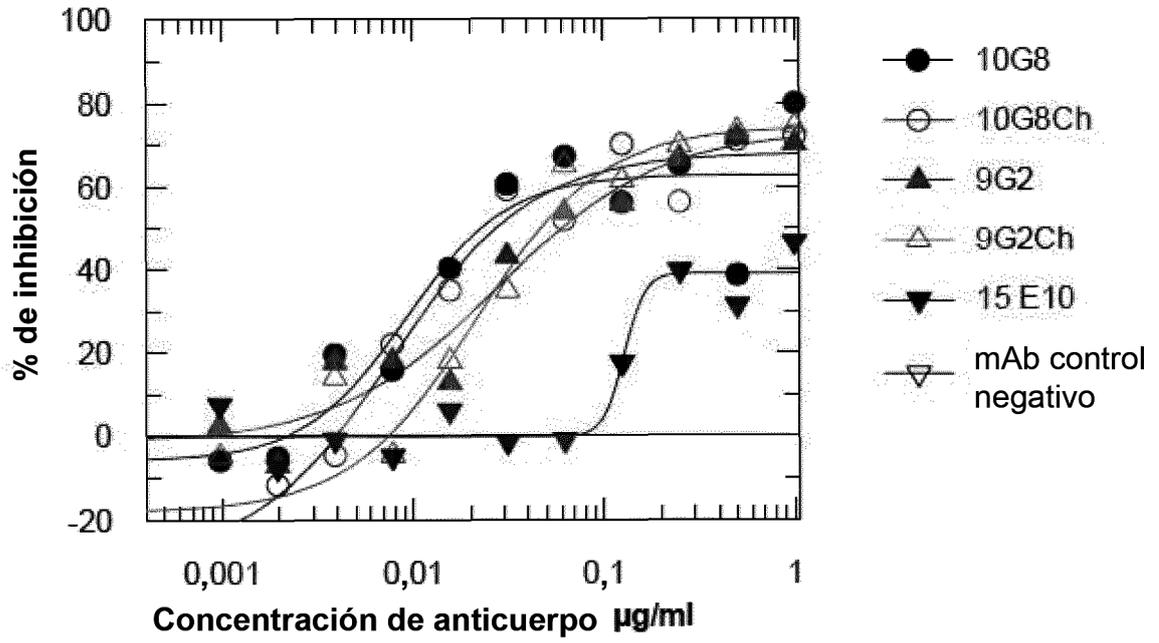


Figura 14: Ensayo de células KB

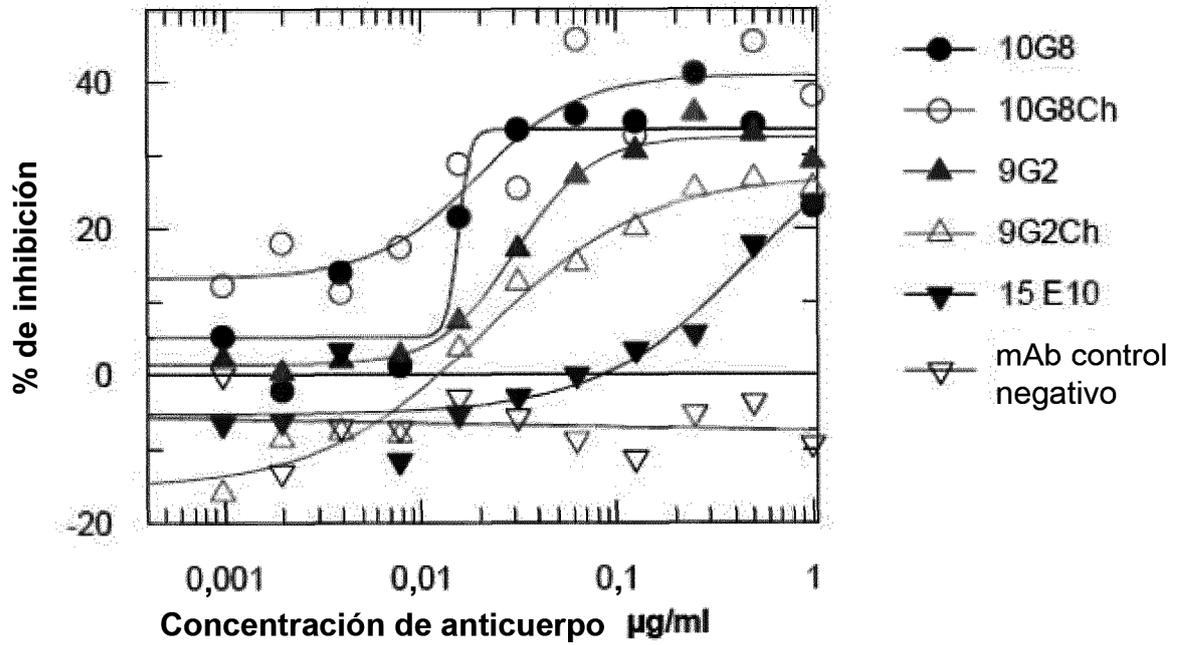


Figura 15: Ensayo de OMS y gp130 humanos endógenos

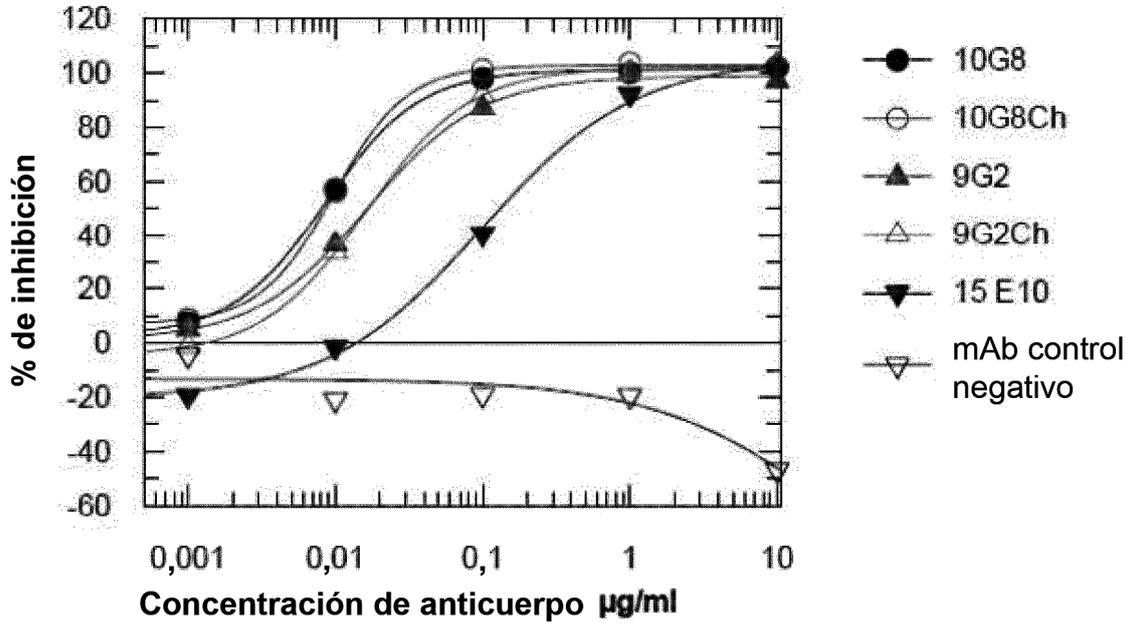


Figura 16: Ensayo de células KB de LIF humano

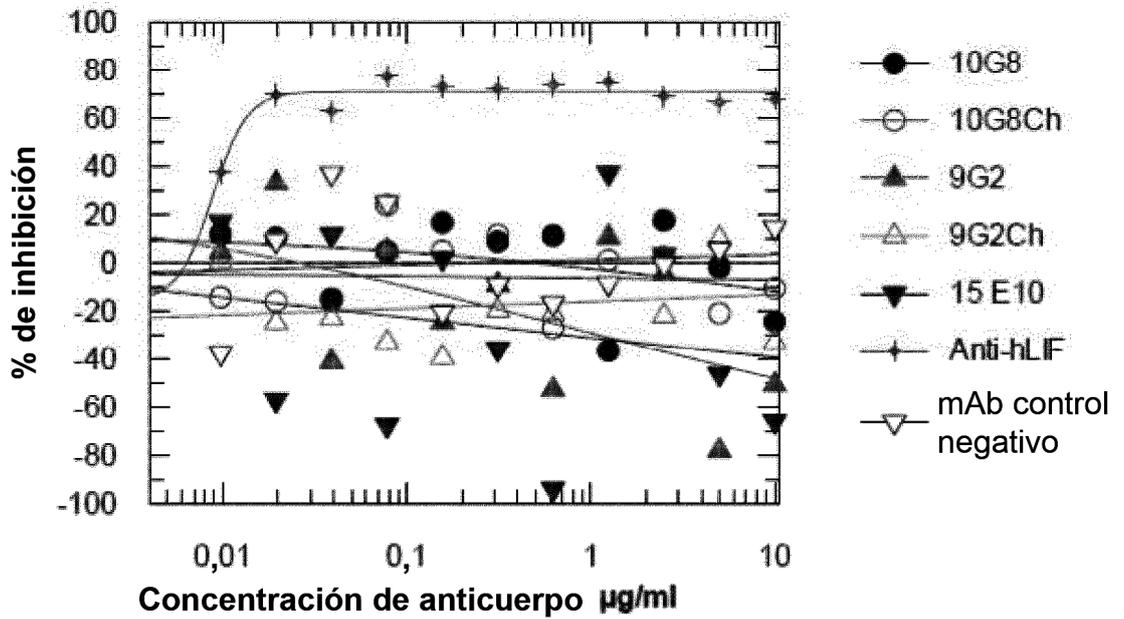


Figura 17: Ensayo de células KB

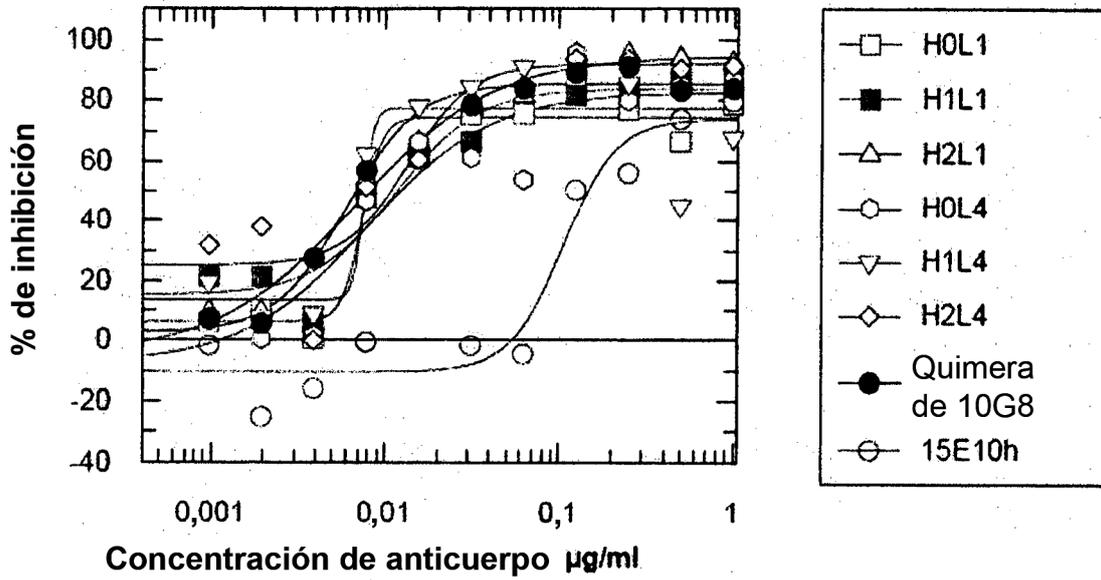


Figura 18: ELISA de gp130 humano

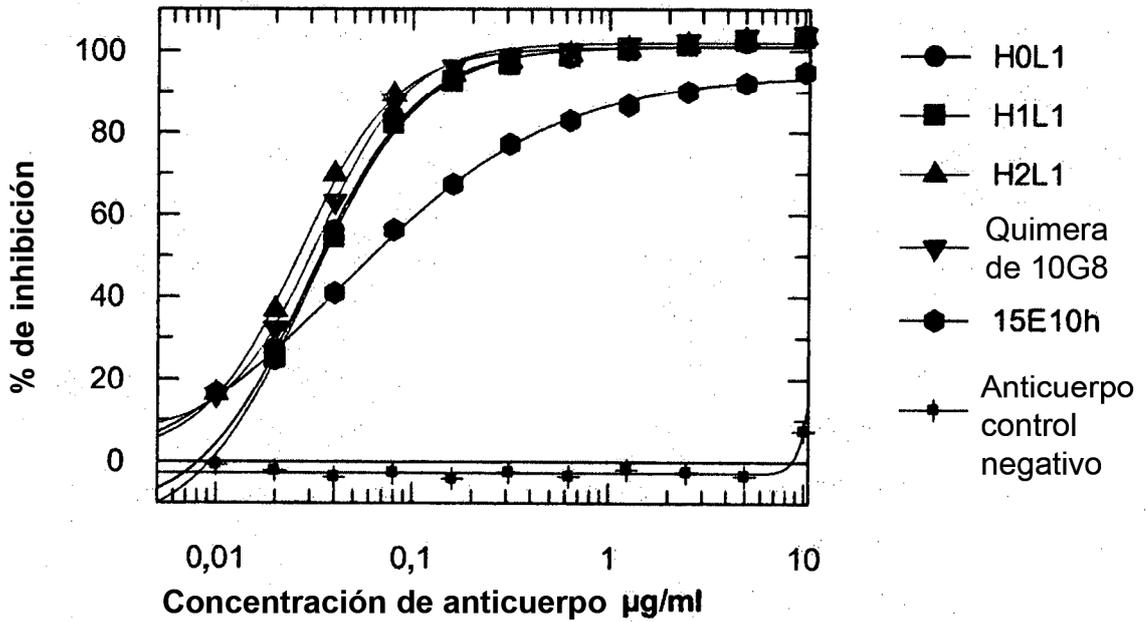


Figura 19: Complejo de unión de mAb10G8-OSM humana

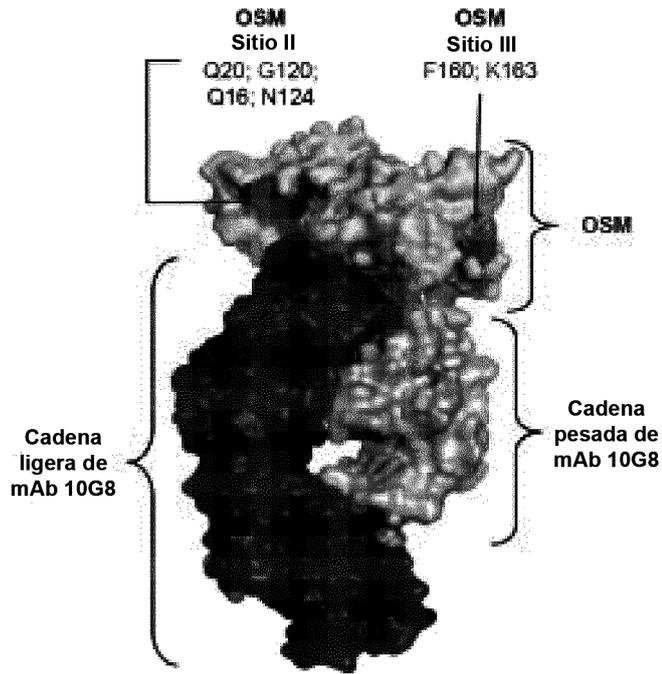


Figura 20: Ensayo de células KB

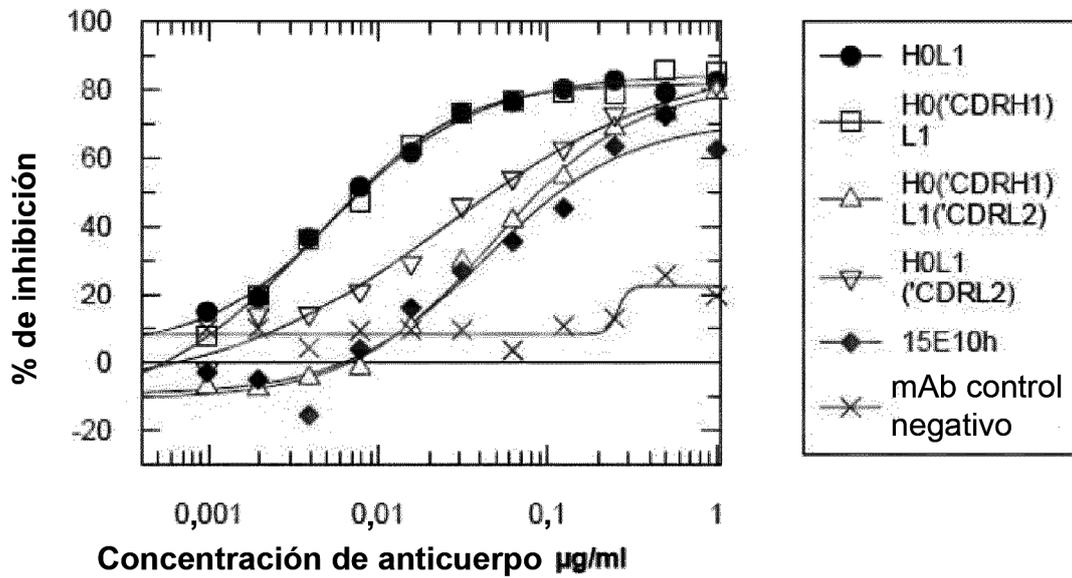


Figura 21: ELISA de gp130 humano

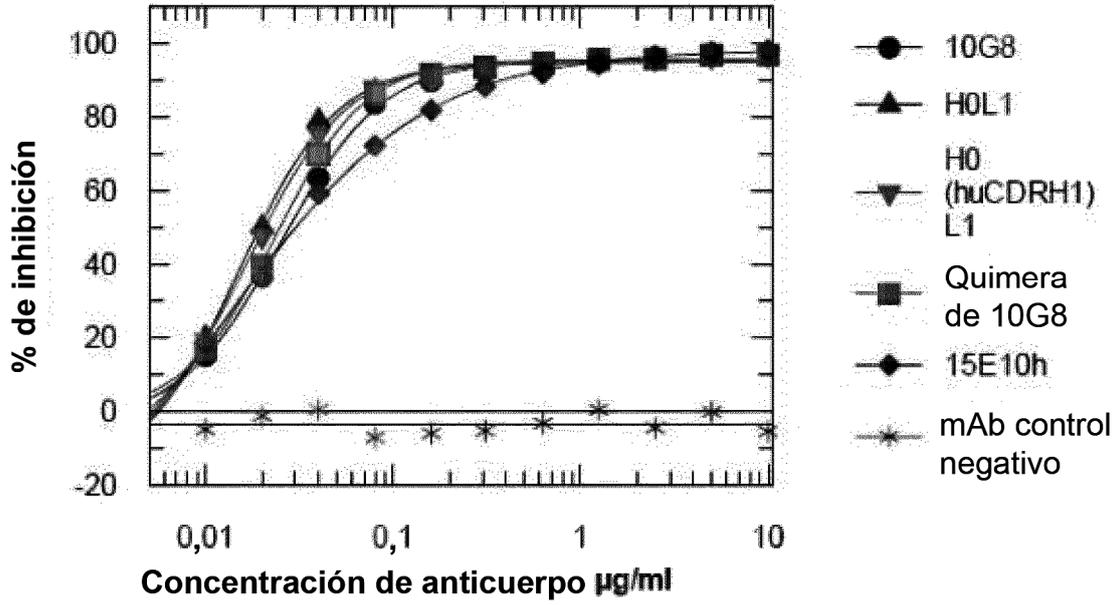


Figura 22: Ensayo de células KB

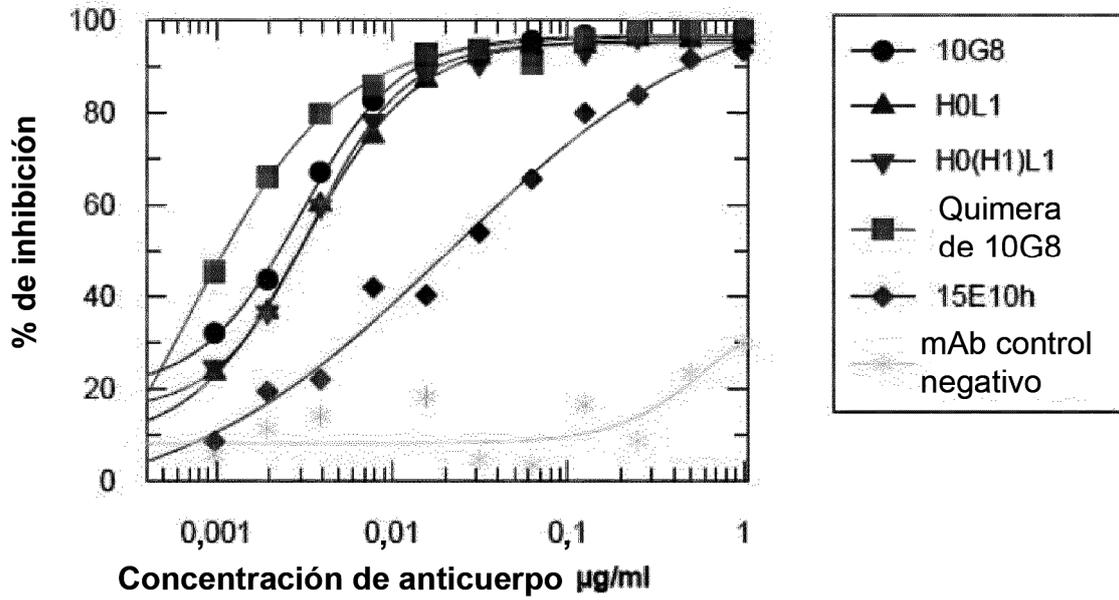


Figura 23: Ensayo de células KB

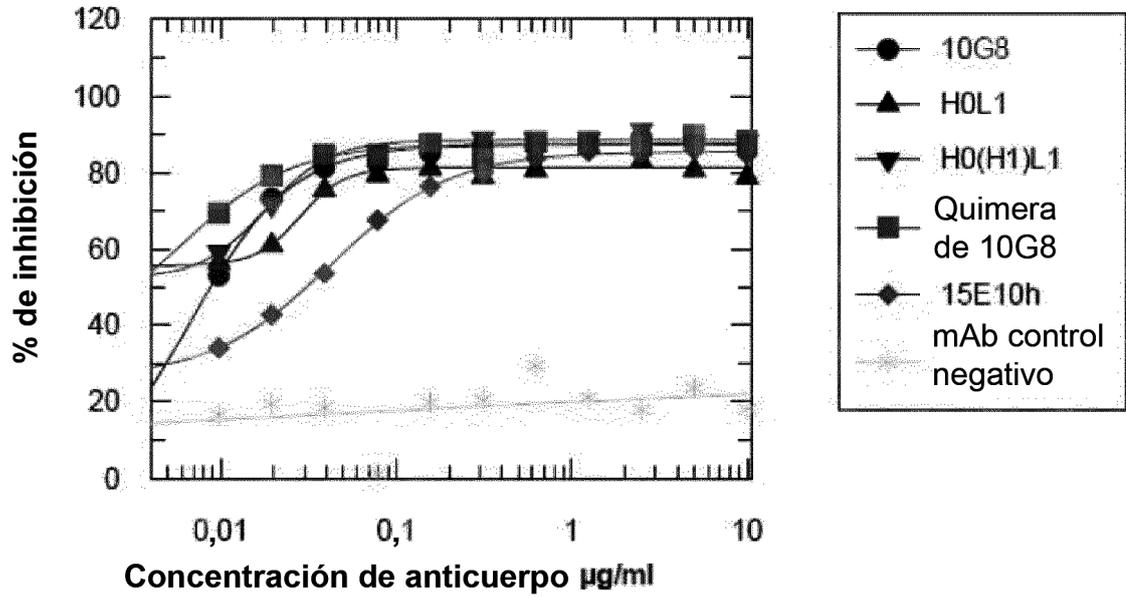


Figura 24:

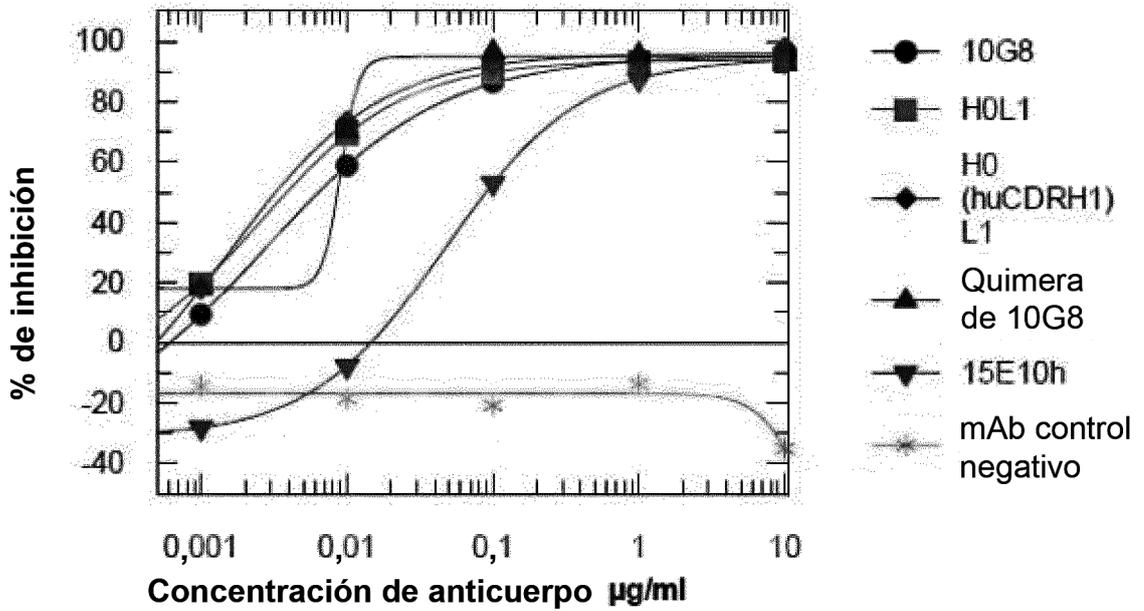


Figura 25:

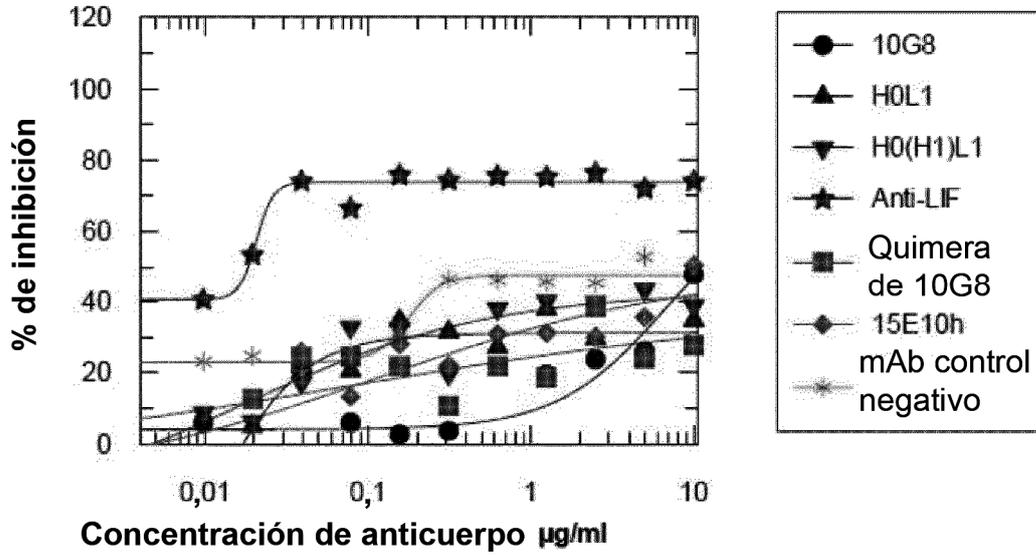


Figura 26: Ensayo de hepatocitos humanos-SAA

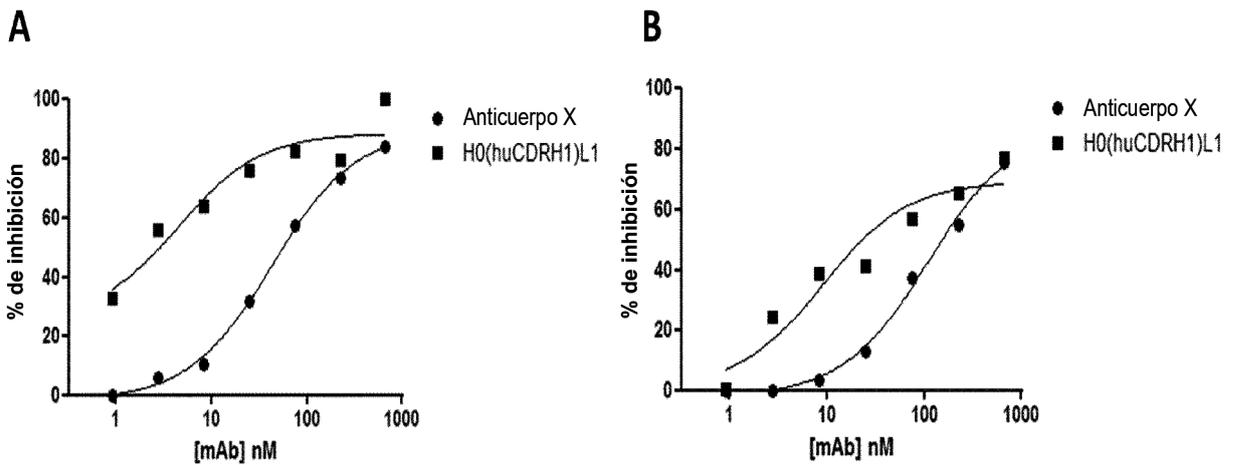


Figura 27: Ensayo de hepatocitos humanos-CRP

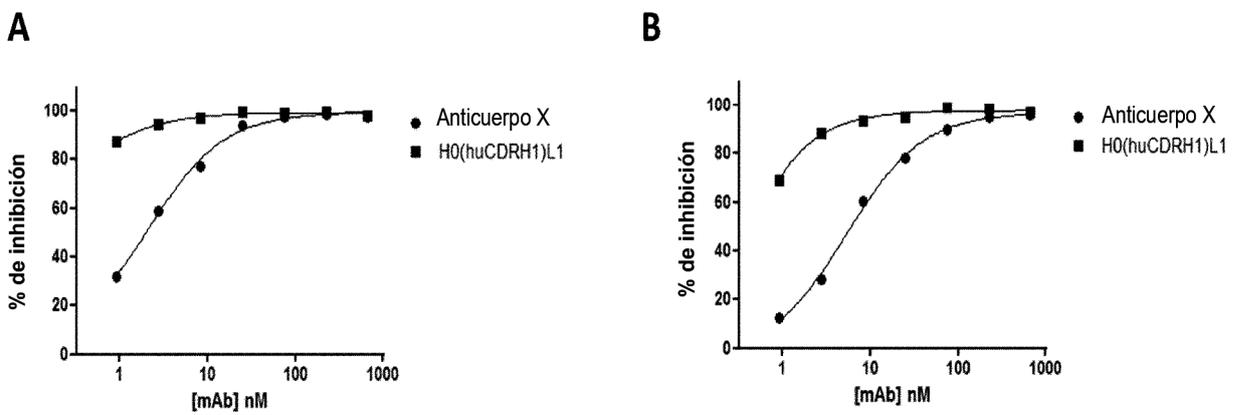


Figura 28: Ensayo de sinoviocitos similares a fibroblastos humanos-IL-6

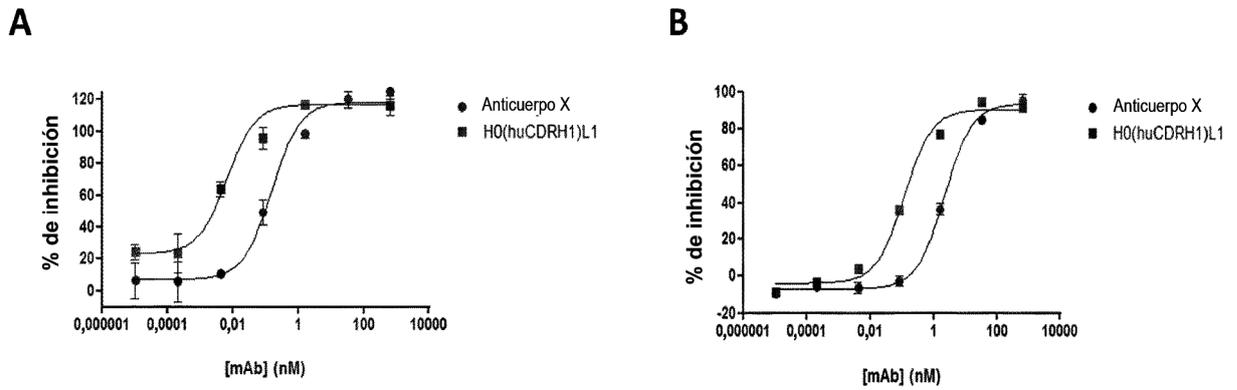


Figura 29: Ensayo de sinoviocitos similares a fibroblastos humanos-MCP-1

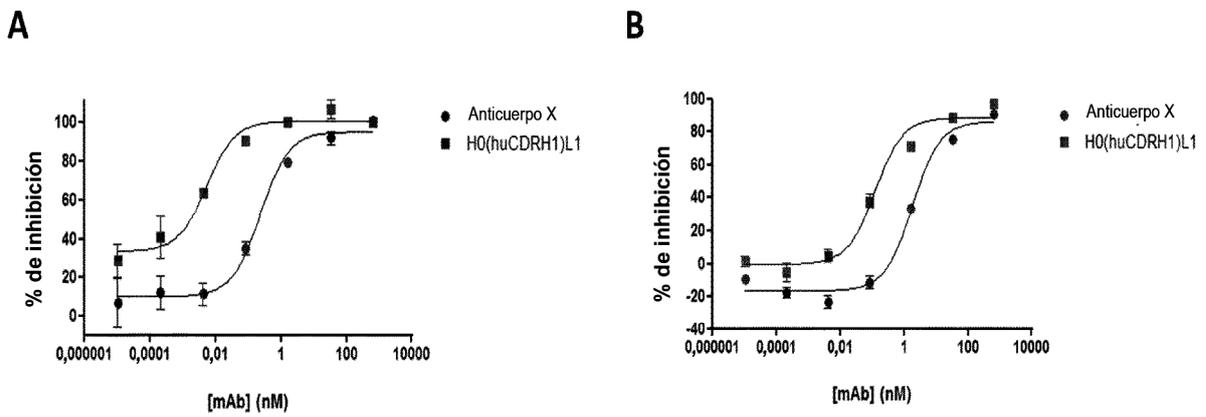


Figura 30: Ensayo de células endoteliales de vena umbilical humanas

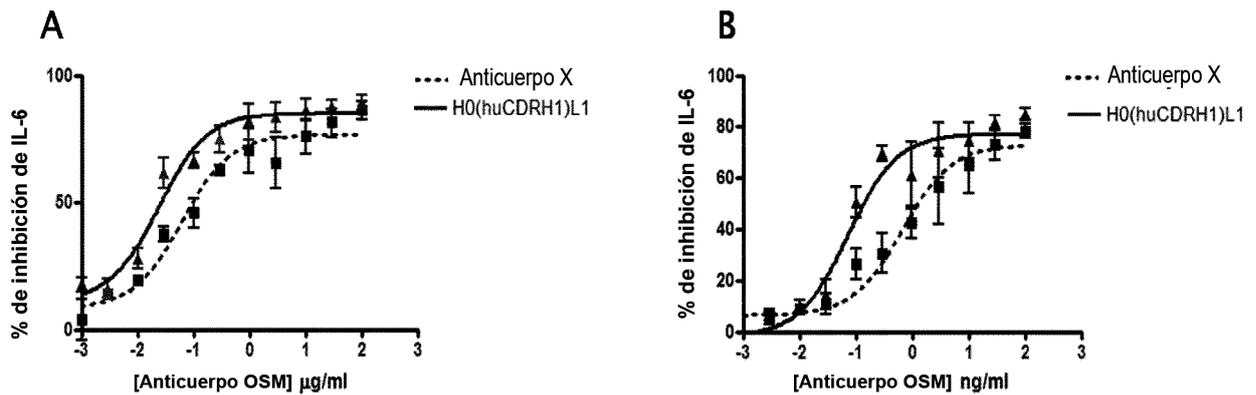


Figura 31: Ensayo de fibroblastos humanos-MCP-1

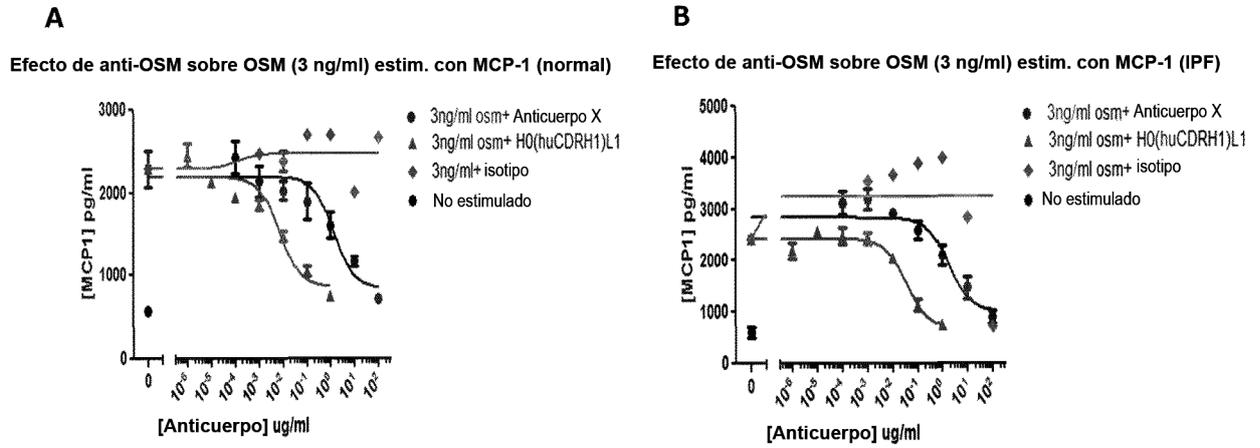


Figura 32: Ensayo de fibroblastos humanos-IL-6

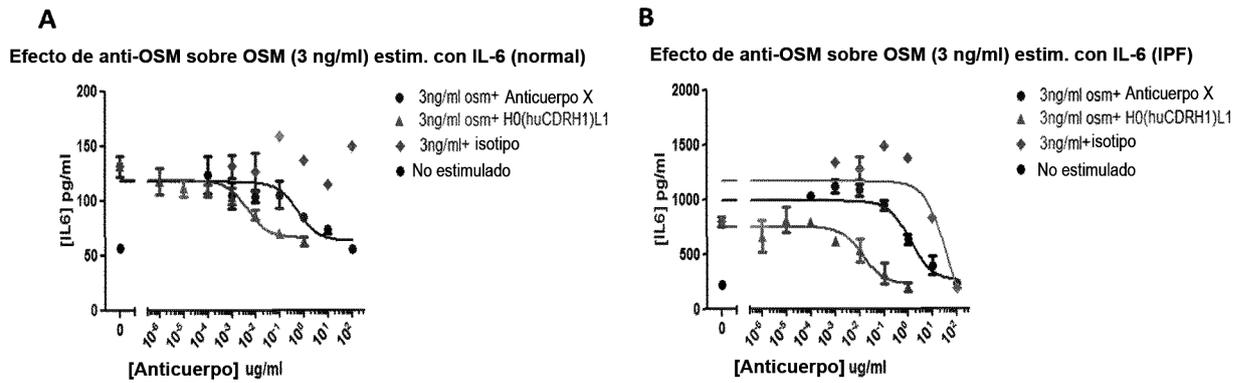


Figura 33

Pos	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	101	102
Ala	5,76 E-10	5,72 E-10	4,86 E-10	6,59 E-10	5,41 E-10	8,55 E-09	8,10 E-09	4,81 E-09	3,94 E-10	8,69 E-10	1,55 E-09	3,38 E-10
Cys		6,64 E-10	6,51 E-10	1,50 E-09	7,08 E-10	8,95 E-09	8,92 E-09	8,12 E-09		5,86 E-10		
Asp	4,42 E-10			4,94 E-10	4,24 E-09		4,27 E-08	2,32 E-08		6,72 E-10	3,55 E-10	
Glu	7,85 E-10		1,10 E-09		1,28 E-09			4,91 E-10	4,82 E-10	6,88 E-10	4,26 E-10	
Phe		6,1 E-10	6,37 E-10	3,25 E-10	2,54 E-07		4,47 E-10	3,37 E-09	3,65 E-10	4,50 E-10	2,60 E-09	4,25 E-10
Gly	5,17 E-10	4,88 E-10	3,07 E-10	1,11 E-09	5,25 E-09	1,81 E-08	6,31 E-08	2,21 E-08	3,88 E-10	6,61 E-10	7,10 E-10	4,06 E-10
His	4,99 E-10	4,80 E-10		1,74 E-10	1,56 E-08		3,97 E-08	3,62 E-08	1,20 E-09			
Ile				7,18 E-09	1,69 E-09	1,87 E-08	2,46 E-08	4,55 E-08				
Lys		6,71 E-10		2,45 E-08	4,06 E-09	4,31 E-09		4,71 E-08		8,73 E-10	2,83 E-09	
Leu	5,68 E-10	5,55 E-10	2,19 E-09	7,42 E-10	1,56 E-09	4,20 E-08	3,35 E-09	1,62 E-08	4,24 E-10			4,26 E-10
Met	6,49 E-10		8,09 E-10	6,93 E-09	1,62 E-09		5,19 E-09	4,03 E-08				
Asn					1,33 E-09		6,58 E-09	4,02 E-08				
Pro	4,42 E-10	2,35 E-09	3,15 E-08	9,86 E-10	5,53 E-10	3,65 E-08		1,14 E-08		1,05 E-09	5,01 E-09	4,11 E-10
Gln	5,70 E-10			7,29 E-10			1,46 E-08	3,35 E-09	1,17 E-09		1,10 E-09	3,37 E-10

ES 2 681 949 T3

Arg	6,84 E-09	1,56 E-08	1,85 E-09	3,02 E-09	6,80 E-09			2,13 E-08	1,09 E-09	1,34 E-09	2,18 E-09	5,33 E-10
Ser	7,60 E-10	4,67 E-10	6,32 E-10	1,09 E-09	8,27 E-10	1,65 E-09	1,83 E-08	7,74 E-09	1,20 E-09	6,61 E-10	7,72 E-10	4,44 E-10
Thr	6,32 E-10	4,97 E-10	3,64 E-09	1,66 E-09	3,99 E-10	4,57 E-10	3,34 E-08	8,57 E-09	1,09 E-09	5,91 E-10	7,07 E-10	
Val	5,70 E-10	4,88 E-10	2,01 E-09	1,00 E-09	7,14 E-10	1,45 E-08	9,05 E-09	4,12 E-08	5,60 E-10	6,75 E-10	4,40 E-10	4,26 E-10
Trp	1,86 E-08	9,79 E-10	1,67 E-09	3,17 E-10	4,99 E-09		6,90 E-09	4,95 E-10	6,87 E-10	7,11 E-10	2,07 E-10	5,33 E-10
Tyr		6,78 E-10		2,07 E-09	4,44 E-10		1,41 E-08	6,76 E-09	3,64 E-10	5,09 E-10		



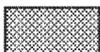
sin unión

NEGRITA

resto de tipo salvaje



3x disminución en la unión



Datos generados en un experimento distinto

Figura 34

