

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 232**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
C07K 16/46	(2006.01)
C12N 1/15	(2006.01)
C12N 1/19	(2006.01)
C12N 1/21	(2006.01)
C12N 5/10	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2011 PCT/JP2011/077603**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12073985**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2011 E 11845786 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2647707**

54 Título: **Agente terapéutico que induce citotoxicidad**

30 Prioridad:

30.11.2010 JP 2010266760
31.05.2011 JP 2011121771
31.10.2011 JP 2011238818

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.12.2018

73 Titular/es:

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)
5-1, Ukima 5-chome
Kita-ku, Tokyo 115-8543, JP

72 Inventor/es:

NEZU, JUNICHI;
ISHIGURO, TAKAHIRO;
NARITA, ATSUSHI;
SAKAMOTO, AKIHISA;
KAWAI, YUMIKO;
IGAWA, TOMOYUKI y
KURAMOCHI, TAICHI

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 693 232 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

Agente terapéutico que induce citotoxicidad

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a complejos polipeptídicos que permiten el tratamiento contra el cáncer al tener células T cerca de las células cancerosas diana y al utilizar la actividad citotóxica de las células T contra las células cancerosas diana.

La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas para tratar o prevenir diversos cánceres, que contienen un agente terapéutico mencionado anteriormente para inducir citotoxicidad celular como principio activo.

10 **Antecedentes de la técnica**

Hasta la fecha, se han desarrollado múltiples anticuerpos terapéuticos que tienen un excelente efecto antitumoral como productos farmacéuticos para tratar el cáncer (documento de no patente 1). Estos anticuerpos terapéuticos son conocidos por ejercer su efecto antitumoral en las células cancerosas mediante la inhibición de señales esenciales para el crecimiento de células cancerosas, la inducción de señales de muerte celular, la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) (documento de no patente 2). CCDA es una citotoxicidad ejercida por células efectoras tales como las células NK y macrófagos contra células cancerosas diana unidas al anticuerpo cuando la región Fc de un anticuerpo se une a un receptor Fc en las células efectoras. Mientras tanto, un complejo de complemento se une al sitio de unión del complemento en una estructura de anticuerpo. CDC es la citotoxicidad que se produce cuando un componente del complemento en el complejo forma un poro a través de la membrana celular de una célula unida al anticuerpo, lo que potencia la entrada de agua o iones en la célula. Aunque los anticuerpos terapéuticos convencionales muestran excelentes actividades, hasta la fecha, la administración de tales anticuerpos condujo sólo a resultados terapéuticos insatisfactorios. Por consiguiente, es deseable desarrollar anticuerpos terapéuticos que ejerzan una mayor actividad de destrucción celular contra el cáncer.

25 Además de los anticuerpos mencionados anteriormente que adoptan CCDA como su mecanismo antitumoral reclutando células NK o macrófagos como células efectoras, los anticuerpos reclutadores de células T (anticuerpos TR) que adoptan la citotoxicidad como su mecanismo antitumoral reclutando células T como células efectoras son conocidos desde la década de 1980 (documentos de no patente 3 a 5). Un anticuerpo TR es un anticuerpo biespecífico que contiene un anticuerpo contra una cualquiera de las subunidades que forman un complejo receptor de células T (CRT) en las células T, en particular un anticuerpo que se une a la cadena épsilon CD3, y un anticuerpo que se une a un antígeno en las células cancerosas diana. Una célula T se acerca a una célula cancerosa cuando el anticuerpo TR se une a la cadena épsilon CD3 y al antígeno canceroso al mismo tiempo, y esto causa un efecto antitumoral contra la célula cancerosa debido a la actividad citotóxica de la célula T.

35 Un anticuerpo llamado "anticuerpo trifuncional" también se conoce como un anticuerpo TR (documentos de no patente 6 y 7). Un anticuerpo trifuncional es un anticuerpo biespecífico de tipo IgG completo en el que un brazo contiene un Fab que se une a un antígeno canceroso y el otro brazo contiene un Fab que se une a la cadena épsilon CD3. El efecto terapéutico contra la ascitis maligna se ha demostrado mediante la administración de catumaxomab, que es un anticuerpo trifuncional contra EpCAM, en las cavidades peritoneales de pacientes con ascitis maligna que tienen células cancerosas con expresión positiva para EpCAM. El uso de catumaxomab ha sido aprobado en la UE para el tratamiento anterior.

45 Además, recientemente se ha hallado que un anticuerpo TR llamado "acoplador biespecífico de células T (BiTE)" exhibe un fuerte efecto antitumoral (documentos de no patente 8 y 9). BiTE es un anticuerpo TR con una forma molecular en la que el scFv de un anticuerpo contra un antígeno canceroso está vinculado al scFv de un anticuerpo contra la cadena épsilon CD3 a través de un enlazador polipeptídico corto. Se ha notificado que BiTE tiene una actividad antitumoral superior a la de los diversos anticuerpos TR conocidos (documentos de no patente 9 y 10). Específicamente, en comparación con otros anticuerpos TR, BiTE ejerce un efecto antitumoral incluso a una concentración significativamente menor y a una menor relación de células efectoras/células cancerosas (relación ET). También se ha demostrado que el efecto se puede ejercer sin la necesidad de activar células efectoras utilizando IL-2, un anticuerpo agonista CD28 o similar por adelantado. Blinatumomab (MT103), que es un BiTE contra CD19, exhibe una actividad citotóxica mucho más fuerte contra células cancerosas *in vitro* que Rituxan, que es conocido por producir un excelente efecto clínico. Además, se ha notificado que blinatumomab muestra un efecto antitumoral extremadamente superior en los ensayos clínicos de fase I y II realizados recientemente (documento de no patente 11).

55 El hecho de que el catumaxomab se haya aprobado como un agente terapéutico que demuestra el efecto de un fármaco clínico, y que los múltiples BiTE, que incluye blinatumomab, ejerzan un fuerte efecto antitumoral, sugiere que los anticuerpos TR que reclutan células T como células efectoras tienen un potencial significativamente mayor como agente antitumoral en comparación con los anticuerpos convencionales que utilizan CCDA como su mecanismo de acción.

Sin embargo, se sabe que un anticuerpo trifuncional se une a una célula T y a una célula tal como una célula NK o macrófago al mismo tiempo de manera independiente del antígeno canceroso y, como resultado, los receptores expresados en las células se reticulan y la expresión de diversas citoquinas se induce de manera independiente del antígeno canceroso. Se piensa que la administración sistémica de un anticuerpo trifuncional causa efectos secundarios similares a las tormentas de citoquinas como resultado de tal inducción de la expresión de citoquinas. De hecho, se ha notificado que, en el ensayo clínico de fase I, una dosis muy baja de 5 µg/cuerpo fue la dosis de tolerancia máxima para la administración sistémica de catumaxomab a pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, y que la administración de una dosis más alta causa varios efectos secundarios graves (documento de no patente 12). Cuando se administra en una dosis tan baja, catumaxomab nunca puede alcanzar el nivel en sangre efectivo. Es decir, el efecto antitumoral esperado no se puede lograr administrando catumaxomab a una dosis tan baja.

Mientras tanto, a diferencia del catumaxomab, BiTE no tiene un sitio de unión al receptor Fcγ y, por lo tanto, no reticula los receptores expresados en células T y en células tales como las células NK y macrófagos de una manera dependiente del antígeno canceroso. Por consiguiente, se ha demostrado que BiTE no causa la inducción de citoquinas independiente del antígeno canceroso que se observa cuando se administra catumaxomab. Sin embargo, dado que BiTE es una molécula de anticuerpo modificada de bajo peso molecular sin una región Fc, el problema es que su semivida en sangre después de la administración a un paciente es significativamente más corta que los anticuerpos de tipo IgG utilizados convencionalmente como anticuerpos terapéuticos. De hecho, se ha notificado que la semivida en sangre de BiTE administrado *in vivo* es de aproximadamente varias horas (Documentos de no patente 13 y 14). En los ensayos clínicos de blinatumomab, se administra mediante infusión intravenosa continua utilizando una minibomba. Este método de administración no solo es extremadamente inconveniente para los pacientes, sino que también tiene el riesgo potencial de accidentes médicos debido a un mal funcionamiento del dispositivo o similar. En consecuencia, no se puede decir que tal método de administración sea deseable.

El documento de no patente 15 describe modificaciones clave en el desarrollo de anticuerpos biespecíficos que pueden mejorar su eficacia y estabilidad.

El documento de no patente 16 describe la inducción de la inmunidad antitumoral en anticuerpos trifuncionales en pacientes con carcinomatosis peritoneal.

El documento de patente 1 describe regiones constantes de anticuerpo mejoradas.

Documentos de la técnica anterior

- [Documentos de no patente]
- [Documento de no patente 1] *Clin Cancer Res.* (2010) 16 (1), 11-20
- [Documento de no patente 2] *Drug Des Devel Ther* (2009) 3, 7-16
- [Documento de no patente 3] *Nature* (1985) 314 (6012), 628-31
- [Documento de no patente 4] *Int J Cancer* (1988) 41 (4), 609-15
- [Documento de no patente 5] *Proc Natl Acad Sci USA* (1986) 83 (5), 1453-7
- [Documento de no patente 6] *Cancer Treat Rev.* (2010) 36 (6), 458-67
- [Documento de no patente 7] *Expert Opin Biol Ther* (2010) 10 (8), 1259-69
- [Documento de no patente 8] *Proc Natl Acad Sci USA.* (1995) 92 (15), 7021-5
- [Documento de no patente 9] *Drug Discov Today* (2005), 10 (18), 1237-44
- [Documento de no patente 10] *Trends Biotechnol* (2004) 22 (5), 238-44
- [Documento de no patente 11] *Science* (2008), 321 (5891), 974-7
- [Documento de no patente 12] *Cancer Immunol Immunother* (2007) 56 (10), 1637-44
- [Documento de no patente 13] *Cancer Immunol Immunother.* (2006) 55 (5), 503-14
- [Documento de no patente 14] *Cancer Immunol Immunother.* (2009) 58 (1), 95-109
- [Documento de no patente 15] *Curr Opin Mol Ther* (2010) 12(3), 340-349
- [Documento de no patente 16] *J Exp & Clin Cancer Res* (2009), 28(18), 1-10
- [Documento de patente]
- [Documento de patente 1] WO 2009/041613

Compendio de la invención

[Problemas a resolver por la invención]

La presente invención se logró en vista de las circunstancias anteriores. Un objetivo de la presente invención es proporcionar complejos polipeptídicos que permitan el tratamiento contra el cáncer al tener células T cerca de las células cancerosas dianas y al utilizar la citotoxicidad de las células T contra las células cancerosas diana. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento o prevención de diversos cánceres, que comprenden un agente terapéutico mencionado anteriormente para inducir citotoxicidad celular como principio activo.

[Medios para resolver los problemas]

Los presentes inventores descubrieron nuevos complejos polipeptídicos que retienen la fuerte actividad antitumoral que posee BiTE y tienen una larga semivida en sangre, así como excelentes propiedades de seguridad que no provocan la inducción de una tormenta de citoquinas independiente del antígeno canceroso o similares. Los presentes inventores también descubrieron que los complejos polipeptídicos pueden dañar varias células diana cuando los dominios de unión a antígeno de los complejos polipeptídicos están sustituidos. Basándose en los hallazgos anteriores, los presentes inventores demostraron que los complejos polipeptídicos de la presente invención dañan las células cancerosas. Los presentes inventores también revelaron que se logra una citotoxicidad celular más eficiente mediante la regulación de la asociación de la interfaz CH1/CL y la introducción de "botones en ojales" (KiH, por sus siglas en inglés) en los complejos polipeptídicos. Además, los presentes inventores demostraron que se pueden tratar o prevenir diversos cánceres utilizando agentes terapéuticos para inducir la citotoxicidad celular que comprende un complejo polipeptídico de la presente invención como principio activo.

Más específicamente, la presente invención proporciona lo siguiente:

[1] un complejo polipeptídico que comprende:

(1) un dominio de unión al antígeno canceroso;

(2) uno cualquiera de los dominios Fc de las SEQ ID NOs: 23, 24, 25 y 26 en el que se muta un aminoácido que forma el dominio Fc, en donde el mutante del dominio Fc ha reducido la actividad de unión al receptor Fcγ por dicha mutación en comparación con el complejo polipeptídico de control que comprende el dominio Fc del mismo isotipo seleccionado entre SEQ ID NOs: 23, 24, 25 y 26, y en donde el mutante del dominio Fc ha reducido la actividad de unión a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIA, y/o FcγRIIIB; y

(3) un dominio de unión a CD3,

en donde el dominio de unión a antígeno y el dominio de unión a CD3 son cada uno un Fab monovalente, y en donde

(i) el fragmento Fv de cadena pesada de un Fab monovalente que forma el dominio de unión a antígeno está vinculado a uno de los polipéptidos que forman el dominio Fc a través de un dominio CH1 y el fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CL; y el fragmento Fv de cadena pesada del Fab que forma el dominio de unión a CD3 está vinculado al otro polipéptido que forma el dominio Fc a través de un dominio CH1 y el fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CL;

(ii) el fragmento Fv de cadena pesada de un Fab monovalente que forma el dominio de unión a antígeno está vinculado a uno de los polipéptidos que forman el dominio Fc a través de un dominio CH1 y el fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CL; y el fragmento Fv de cadena ligera del Fab que forma el dominio de unión a CD3 está vinculado al otro polipéptido que forma el dominio Fc a través de un dominio CH1 y el fragmento Fv de cadena pesada del Fab está vinculado a un dominio CL;

(iii) el fragmento Fv de cadena pesada de un Fab monovalente que forma el dominio de unión a antígeno está vinculado a uno de los polipéptidos que forman el dominio Fc a través de un dominio CH1 y el fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CL; y el fragmento Fv de cadena pesada del Fab que forma el dominio de unión a CD3 está vinculado al otro polipéptido que forma el dominio Fc a través de un dominio CL; y el fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CH1;

(iv) el fragmento Fv de cadena pesada de un Fab monovalente que forma el dominio de unión a CD3 está vinculado a uno de los polipéptidos que forman el dominio Fc a través de un dominio CH1 y el fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CL; y el fragmento Fv de cadena ligera del Fab que forma el dominio de unión a antígeno está vinculado al otro polipéptido que forma el dominio Fc a través de un dominio CH1 y el fragmento Fv de cadena pesada del Fab está vinculado a un dominio CL;

o

(v) el fragmento Fv de cadena pesada de un Fab monovalente que forma el dominio de unión a CD3 está vinculado a uno de los polipéptidos que forman el dominio Fc a través de un dominio CH1 y el fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CL; y el fragmento Fv de cadena pesada del Fab que forma el dominio de unión a antígeno está vinculado al otro polipéptido que forma el dominio Fc a través de un dominio CL; y el fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CH1.

[2] el complejo polipeptídico de [1], en donde el dominio Fc comprende uno cualquiera de los aminoácidos siguientes:

la secuencia de aminoácido de posiciones 118 a 260 (numeración UE) es la secuencia descrita en SEQ ID NO: 24; o

la secuencia de aminoácido de posiciones 261 a 447 (numeración UE) es la secuencia descrita en SEQ ID NO: 26;

[3] el complejo polipeptídico de [1], en donde el dominio Fc comprende una mutación en los aminoácidos de SEQ ID NO: 23 que forman el dominio Fc y en donde los aminoácidos que forman el dominio Fc comprenden una mutación en una cualquiera de las siguientes posiciones:

220, 226, 229, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 264, 265, 266, 267, 269, 270, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 325, 327, 328, 329, 330, 331 y 332 (numeración UE);

[4] el complejo polipeptídico de [3], i) en donde el dominio Fc está en el dominio Fc que comprende una sustitución del aminoácido en la posición 233, 234, 235, 236, 237, 327, 330 o 331 (numeración UE) con el aminoácido en una posición correspondiente (numeración UE) en IgG2 o IgG4 correspondiente; o

ii) en donde el dominio Fc comprende una mutación de aminoácidos en la posición 234, 235, y/o 297 (numeración UE); y los aminoácidos en la posición 234, 235, y/o 297 son sustituidos con alanina:

[5] el complejo polipeptídico de uno cualquiera de [2] a [4], en donde las secuencias de dos polipéptidos que forman el dominio Fc son diferentes entre sí, y en donde el aminoácido en la posición 349 es sustituido con cisteína y el aminoácido en la posición 366 (numeración UE) es sustituido con triptófano entre los residuos de aminoácido de uno de los dos polipéptidos que forman el dominio Fc; y en donde el aminoácido en la posición 356 es sustituido con cisteína, el aminoácido en la posición 366 es sustituido con serina, el aminoácido en la posición 368 es sustituido con alanina, y el aminoácido en la posición 407 (numeración UE) es sustituido con valina entre los residuos de aminoácidos del otro polipéptido;

[6] el complejo polipeptídico de uno cualquiera de [2] a [4], en donde las secuencias de dos polipéptidos que forman el dominio Fc son diferentes entre sí, y en donde el aminoácido en la posición 356 (numeración UE) es sustituido con lisina entre los residuos de aminoácido de uno de los dos polipéptidos que forman el dominio Fc; el aminoácido en la posición 439 (numeración UE) es sustituido con ácido glutámico en el otro polipéptido, y el aminoácido en la posición 435 (numeración UE) es sustituido con arginina entre los residuos de aminoácidos de cualquiera de los dos polipéptidos;

[7] el complejo polipeptídico de [5] o [6], en donde la secuencia GK es delecionada de los extremos carboxiterminales de dos polipéptidos que forman el dominio Fc;

[8] un agente terapéutico para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer que comprende como principio activo el complejo polipeptídico de uno cualquiera de [1] a [7]; y en particular en donde el cáncer es cáncer hepático o cáncer de pulmón.

[Efectos de la invención]

La presente invención proporciona nuevos complejos polipeptídicos que retienen la fuerte actividad antitumoral de BiTE y que tienen una larga semivida en sangre, así como excelentes propiedades de seguridad que no provocan la inducción de una tormenta de citoquinas independiente del antígeno canceroso. Cuando se sustituye el dominio de unión a antígeno de un complejo polipeptídico de la presente invención, los agentes terapéuticos que comprenden el complejo polipeptídico como principio activo para inducir citotoxicidad celular pueden dirigirse y dañar varias células, incluidas las células cancerosas. Por consiguiente, varios cánceres pueden ser tratados o prevenidos. Esto permite tratamientos deseables que son altamente seguros y convenientes, y reducen la carga física para los pacientes.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico que muestra la comparación de las actividades citotóxicas de ERY1 GPC3 (BiTE GPC3), ERY2 GPC3 y un anticuerpo anti-GPC3 de tipo IgG. El cuadrado cerrado (■), el triángulo cerrado (▲) y el cuadrado abierto (□) representan las actividades citotóxicas de ERY1 GPC3 (BiTE GPC3), ERY2 GPC3, el anticuerpo anti-GPC3 de tipo IgG, respectivamente.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra la comparación de las actividades citotóxicas de BiTE GPC3 y ERY5 GPC3. El cuadrado cerrado (■) y el círculo abierto (○) representan las actividades citotóxicas de BiTE GPC3 y ERY5 GPC3, respectivamente.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra la comparación de las actividades citotóxicas de BiTE GPC3 y ERY6 GPC3. El cuadrado cerrado (■) y el triángulo cerrado (▲) representan las actividades citotóxicas de BiTE GPC3 y ERY6 GPC3, respectivamente.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra la comparación de las actividades citotóxicas de BiTE GPC3 y ERY7 GPC3. El cuadrado cerrado (■) y el diamante cerrado (◆) representan las actividades citotóxicas de BiTE GPC3 y ERY7 GPC3, respectivamente.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra la comparación de las actividades citotóxicas de BiTE GPC3, ERY8-2 GPC3, ERY9-1 GPC3 y ERY10-1 GPC3. El cuadrado cerrado (■), el triángulo cerrado (▲), el círculo abierto (○) y el cuadrado abierto (□) representan las actividades citotóxicas de BiTE GPC3, ERY8-2 GPC3, ERY9-1 GPC3 y ERY10-1 GPC3, respectivamente.

La Fig. 6 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral *in vivo* de ERY8-2 GPC3 en el modelo de premezcla PC-10. El cuadrado abierto (□) y el diamante cerrado (◆) indican cambios en el volumen tumoral del grupo de administración ERY7 GPC3 y del grupo de control (administración de TFS), respectivamente.

La Fig. 7 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral *in vivo* de ERY10-1 GPC3 en el modelo de pre-mezcla PC-10. El cuadrado abierto (□) y el diamante cerrado (◆) indican cambios en el volumen tumoral del grupo de administración ERY10-1 GPC3 y del grupo de control (administración de TFS), respectivamente.

La Fig. 8 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral *in vivo* de ERY10-1 GPC3 en el modelo de transferencia de células T PC-10. El cuadrado abierto (□) y el diamante cerrado (◆) indican cambios en el volumen tumoral del grupo de administración ERY10-1 GPC3 y del grupo de control (administración de TFS), respectivamente.

La Fig. 9 es un gráfico que muestra el curso temporal de las concentraciones plasmáticas de ERY9-1 GPC3 y ERY10-1 GPC3 determinadas utilizando células Ba/F3 que expresan GPC3. El diamante cerrado (◆) y el cuadrado

abierto (□) indican el curso temporal de la concentración plasmática para ERY9-1 GPC3 y ERY10-1 GPC3, respectivamente.

La Fig. 10 es un gráfico que muestra el curso temporal de las concentraciones plasmáticas de ERY9-1 GPC3 y ERY10-1 GPC3 determinadas utilizando células Ba/F3 que expresan CD3. El diamante cerrado (◆) y el cuadrado abierto (□) indican el curso temporal de la concentración plasmática para ERY9-1 GPC3 y ERY10-1 GPC3, respectivamente.

La Fig. 11 es un gráfico que muestra la evaluación de BiTE GPC3, ERY9-1 GPC3, ERY10-1 GPC3, ERY15-1 GPC3 y catumaxomab por su capacidad para inducir citoquinas de manera independiente del antígeno canceroso.

La Fig. 12 es un gráfico que muestra las citotoxicidades *in vitro* de ERY18 L1 GPC3, ERY18L2 GPC3, ERY18L3 GPC3, ERY18L4 GPC3 y ERY18S1 GPC3. El triángulo cerrado (▲), el círculo cerrado (●), el cuadrado cerrado (■), el cuadrado abierto (□), y el diamante abierto (◇) representan las actividades citotóxicas de ERY18 L1 GPC3, ERY18 L2 GPC3, ERY18 L3 GPC3, ERY18 L4 GPC3, y ERY18 S1 GPC3, respectivamente.

La Fig. 13 es un gráfico que muestra la comparación de las actividades citotóxicas *in vitro* de ERY18 L3 GPC3 y ERY10-1 GPC3. El cuadrado cerrado (■) y el cuadrado abierto (□) representan las actividades citotóxicas de ERY18 L3 GPC3 y ERY10-1 GPC3, respectivamente.

La Fig. 14 es un gráfico que muestra la comparación de las actividades citotóxicas *in vitro* de ERY19-3 GPC3 y BiTE GPC3. El cuadrado abierto (□) y el cuadrado cerrado (■) representan las actividades citotóxicas de ERY19-3 GPC3 y BiTE GPC3, respectivamente.

La Fig. 15A es un cromatograma que muestra los resultados del análisis por cromatografía de exclusión por tamaños de CM en el que se expresó NTA1L/NTA1R/GC33-k0. La Fig. 15B es un cromatograma que muestra los resultados del análisis por cromatografía de exclusión por tamaños de CM en el que se expresó NTA2L/NTA2R/GC33-k0.

La Fig. 16 muestra diagramas que representan dominios que forman los siguientes complejos polipeptídicos descritos en los Ejemplos en esta memoria: BiTE GPC3, ERY2 GPC3, ERY5 GPC3, ERY6 GPC3, ERY7 GPC3, ERY8-2 GPC3, ERY9-1 GPC3, ERY10-1 GPC3, ERY15 GPC3, ERY18 GPC3 y ERY19-3 GPC3. El dominio con líneas cruzadas representa la región variable de la cadena P del anticuerpo antígeno anti-cancerígeno (GPC3, EpCAM, EGFR); el dominio con líneas diagonales representa la región variable de la cadena L del anticuerpo de antígeno anti-cancerígeno (GPC3, EpCAM, EGFR); el dominio con líneas de puntos representa la región variable de la cadena P del anticuerpo anti-CD3; el dominio cerrado representa la región variable de la cadena L del anticuerpo anti-CD3; el dominio abierto representa la región constante del anticuerpo; la cruz representa una mutación silenciosa de Fc; y la estrella representa una mutación que promueve la asociación de Fc heteromérica.

La Fig. 17 muestra diagramas de BiTE GPC3 (A); ERY 10 GPC3 (B); ERY2 GPC3 (C); ERY5 GPC3 (D); ERY6 GPC3 (E); ERY7 GPC3 (F); ERY8-2 GPC3 (G); ERY9-1 GPC3 (H); ERY10-1 GPC3 (I); ERY15 GPC3 (J); ERY18 GPC3 (K); y ERY19-3 GPC3 (L).

La Fig. 18 muestra los residuos de aminoácidos que forman los dominios Fc de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 y su numeración de la UE de Kabat (en esta memoria, también denominado "ÍNDICE DE LA UE").

La Fig. 19 muestra diagramas que representan dominios que forman los siguientes complejos polipeptídicos descritos en los Ejemplos de esta memoria: ERY17-2 GPC3, ERY17-3 GPC3, ERY17-2 EpCAM y ERY17-3 EpCAM. El dominio con líneas cruzadas representa la región variable de la cadena P del anticuerpo de antígeno anti-cancerígeno (GPC3, EpCAM, EGFR); el dominio con líneas diagonales representa la región variable de la cadena L del anticuerpo de antígeno anti-cancerígeno (GPC3, EpCAM, EGFR); el dominio con líneas de puntos representa la región variable de la cadena P del anticuerpo anti-CD3; el dominio cerrado representa la región variable de la cadena L del anticuerpo anti-CD3; el dominio abierto representa la región constante del anticuerpo; la cruz representa una mutación silenciosa de Fc; y la estrella representa una mutación que promueve la asociación de Fc heteromérica.

La Fig. 20 es un gráfico que muestra la comparación de las actividades citotóxicas de BiTE GPC3, ERY17-2 GPC3, ERY17-3 GPC3 y ERY10-1 GPC3. El cuadrado cerrado (■), el triángulo cerrado (▲), el círculo abierto (○) y el cuadrado abierto (□) representan las actividades citotóxicas de BiTE GPC3, ERY17-2 GPC3, ERY17-3 GPC3 y ERY10-1 GPC3, respectivamente.

La Fig. 21 es un gráfico que muestra el efecto antitumoral *in vivo* de ERY17-2 GPC3 en el modelo de transferencia de células T PC-10. El cuadrado abierto (□) y el diamante cerrado (◆) indican cambios en el volumen tumoral del grupo de administración ERY17-2 GPC3 y del grupo de control (administración de TFS), respectivamente.

La Fig. 22 es un gráfico que muestra la comparación de las actividades citotóxicas de ERY17-2 GPC3 y ERY17-2-M20 GPC3. El triángulo cerrado (▲) y el círculo abierto (○) representan las actividades citotóxicas de ERY17-2 GPC3 y ERY17-2-M20 GPC3, respectivamente.

La Fig. 23 es un gráfico que muestra la comparación de las actividades citotóxicas de ERY17-2 EpCAM y ERY17-3 EpCAM. El triángulo cerrado (▲) y el cuadrado abierto (□) representan las actividades citotóxicas de ERY17-2 EpCAM y ERY17-3 EpCAM, respectivamente.

5 La Fig. 24 muestra diagramas que representan dominios que forman los siguientes complejos polipeptídicos descritos en los Ejemplos de esta memoria: GM1, GM2 y GM0. "A" muestra un complejo polipeptídico en el que la asociación de la interfaz CH1/CL está regulada y se introducen modificaciones de "botones en ojales" (KiH). "B" muestra un complejo polipeptídico que no tiene regulación de la asociación de la interfaz CH1/CL o introducción de modificaciones de KiH. El dominio con líneas cruzadas representa la región variable de la cadena P del anticuerpo de antígeno anti-cancerígeno (GPC3 o EpCAM); el dominio con líneas diagonales representa la región variable de la cadena L del anticuerpo de antígeno anti-cancerígeno (GPC3 o EpCAM); el dominio con líneas de puntos representa la región variable de la cadena P del anticuerpo anti-CD3; el dominio cerrado representa la región variable de la cadena L del anticuerpo anti-CD3; el dominio abierto representa la región constante del anticuerpo; la cruz representa una mutación silenciosa de Fc; la estrella representa una mutación que promueve la asociación de Fc heteromérica; y el símbolo en forma de rosca representa una mutación que regula la interacción de la interfaz CH1/CL.

La Fig. 25 es un gráfico que muestra la comparación de las actividades citotóxicas de GM1, GM2 y GM0. El triángulo cerrado (▲), el cuadrado abierto (□) y el círculo abierto (○) representan las actividades citotóxicas de GM1, GM2 y GM0, respectivamente.

La Fig. 26 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica de ERY17-2 EGFR. El triángulo cerrado (▲) representa la actividad citotóxica de ERY17-2 EGFR.

Modo para llevar a cabo la invención

Las definiciones a continuación se proporcionan para ayudar a comprender la presente invención.

Anticuerpo

25 En esta memoria, "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina natural o a una inmunoglobulina producida por síntesis parcial o completa. Los anticuerpos se pueden aislar de fuentes naturales, tales como plasma y suero de origen natural, o sobrenadantes de cultivo de hibridomas productores de anticuerpos. Alternativamente, los anticuerpos pueden sintetizarse parcial o completamente utilizando técnicas tales como recombinación genética. Los anticuerpos preferidos incluyen, por ejemplo, anticuerpos de un isotipo o subclase de inmunoglobulina que pertenecen a los mismos. Las inmunoglobulinas humanas conocidas incluyen anticuerpos de las siguientes nueve clases (isotipos): IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE e IgM. De estos isotipos, los anticuerpos de la presente invención incluyen IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Los expertos en la técnica conocen los métodos de producción de un anticuerpo con actividad de unión deseada. A continuación se muestra un ejemplo que describe un método de producción de un anticuerpo (anticuerpo anti-GPC3) que se une a GPC3, que pertenece a la familia de receptores anclados a GPI (*Int J Cancer*. (2003) 103(4), 455-65). Los anticuerpos que se unen a un antígeno distinto de GPC3 también se pueden producir según el ejemplo que se describe a continuación.

Los anticuerpos anti-GPC3 se pueden obtener como anticuerpos policlonales o monoclonales utilizando métodos conocidos. Los anticuerpos anti-GPC3 producidos preferiblemente son anticuerpos monoclonales derivados de mamíferos. Dichos anticuerpos monoclonales derivados de mamíferos incluyen anticuerpos producidos por hibridomas o células huésped transformadas con un vector de expresión que lleva un gen de anticuerpo mediante técnicas de modificación por ingeniería genética.

Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales pueden producirse utilizando técnicas conocidas, por ejemplo, como se describe a continuación. Específicamente, los mamíferos se inmunizan mediante métodos de inmunización convencionales utilizando una proteína GPC3 como antígeno sensibilizante. Las células inmunes resultantes se fusionan con células parentales conocidas mediante métodos de fusión de células convencionales. Luego, los hibridomas que producen un anticuerpo anti-GPC3 pueden seleccionarse identificando sistemáticamente las células productoras de anticuerpos monoclonales utilizando métodos de identificación sistemática convencionales.

50 Específicamente, los anticuerpos monoclonales se preparan como se menciona a continuación. Primero, el gen GPC3 cuya secuencia de nucleótidos se describe en el número de acceso a RefSeq NM_001164617.1 (SEQ ID NO: 1) puede expresarse para producir una proteína GPC3 mostrada en el número de acceso a RefSeq NP_001158089.1 (SEQ ID NO: 2), que se utilizará como un antígeno sensibilizante para la preparación de anticuerpos. Es decir, una secuencia génica que codifica GPC3 se inserta en un vector de expresión conocido, y las células huésped apropiadas se transforman con este vector. La proteína GPC3 humana deseada se purifica a partir de las células huésped o sus sobrenadantes de cultivo mediante métodos conocidos. Por ejemplo, para preparar GPC3 soluble a partir de sobrenadantes de cultivo, los aminoácidos en las posiciones 564 a 580 que forman la región hidrófoba correspondiente a la secuencia de anclaje a GPI utilizada para anclar GPC3 en la membrana

celular se delecionan de la secuencia polipeptídica GPC3 de la SEQ ID NO: 2, y acto seguido la proteína resultante se expresa en lugar de la proteína GPC3 de la SEQ ID NO: 2. Alternativamente, es posible utilizar una proteína GPC3 natural purificada como antígeno sensibilizante.

5 La proteína GPC3 purificada se puede utilizar como antígeno sensibilizante para la inmunización de mamíferos. También se puede utilizar un péptido GPC3 parcial como antígeno sensibilizante. En este caso, se puede preparar un péptido parcial mediante síntesis química basándose en la secuencia de aminoácidos de GPC3 humana, o insertando un gen de GPC3 parcial en un vector de expresión para su expresión. Alternativamente, se puede producir un péptido parcial degradando una proteína GPC3 con una proteasa. La longitud y la región del péptido GPC3 parcial no están limitadas a realizaciones particulares. Una región preferida puede seleccionarse arbitrariamente a partir de la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 564 a 580 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. El número de aminoácidos que forman un péptido que se va a utilizar como un antígeno sensibilizante es preferiblemente al menos cinco o más, seis o más, o siete o más. Más específicamente, un péptido de 8 a 50 residuos, más preferiblemente de 10 a 30 residuos puede utilizarse como un antígeno sensibilizante.

15 Para sensibilizar el antígeno, alternativamente es posible utilizar una proteína de fusión preparada fusionando un polipéptido o péptido parcial deseado de la proteína GPC3 con un polipéptido diferente. Por ejemplo, los fragmentos de Fc de anticuerpo y las etiquetas peptídicas se utilizan preferiblemente para producir proteínas de fusión a utilizar como antígenos sensibilizantes. Los vectores para la expresión de tales proteínas de fusión pueden construirse fusionando los genes de marco que codifican dos o más fragmentos polipeptídicos deseados e insertando el gen de fusión en un vector de expresión como se ha descrito anteriormente. Los métodos de producción de proteínas de fusión se describen en *Molecular Cloning 2ª ed.* (Sambrook, J *et al.*, *Molecular Cloning 2ª ed.*, 9.47-9.58 (1989) Cold Spring Harbor Lab. Press). Los métodos de preparación de GPC3 a utilizar como antígeno sensibilizante y los métodos de inmunización que utilizan GPC3 se describen específicamente en los documentos WO 2003/000883, WO 2004/022754 y WO 2006/006693.

25 No existe una limitación particular sobre los mamíferos a inmunizar con el antígeno sensibilizante. Sin embargo, es preferible seleccionar los mamíferos considerando su compatibilidad con las células parentales que se utilizarán para la fusión celular. En general, se utilizan preferiblemente roedores, tales como ratones, ratas, hámsteres, conejos y monos.

30 Los animales anteriores se inmunizan con un antígeno sensibilizante por métodos conocidos. Los métodos de inmunización generalmente realizados incluyen, por ejemplo, inyección intraperitoneal o subcutánea de un antígeno sensibilizante en mamíferos. Específicamente, un antígeno sensibilizante se diluye apropiadamente con TFS (solución salina tamponada con fosfato), solución salina fisiológica o similares. Si se desea, un adyuvante convencional, tal como adyuvante completo de Freund, se mezcla con el antígeno y la mezcla se emulsiona. Acto seguido, el antígeno sensibilizante se administra a un mamífero varias veces en intervalos de 4 a 21 días. Se pueden utilizar excipientes apropiados en la inmunización con el antígeno sensibilizante. En particular, cuando se utiliza un péptido parcial de bajo peso molecular como antígeno sensibilizante, a veces es deseable acoplar el péptido de antígeno sensibilizante a una proteína portadora, tal como albúmina o hemocianina de la lapa californiana para la inmunización.

40 Alternativamente, los hibridomas que producen un anticuerpo deseado se pueden preparar utilizando inmunización con ADN como se menciona a continuación. La inmunización con ADN es un método de inmunización que confiere inmunoestimulación mediante la expresión de un antígeno sensibilizante en un animal inmunizado como resultado de la administración de un vector de ADN construido para permitir la expresión de un gen que codifica la proteína del antígeno en el animal. En comparación con los métodos de inmunización convencionales en los que se administra un antígeno proteico a los animales que se van a inmunizar, se espera que la inmunización con ADN sea superior en cuanto a que:

- se puede proporcionar una inmunoestimulación mientras se retiene la estructura de una proteína de membrana tal como GPC3; y
- no hay necesidad de purificar el antígeno para la inmunización.

50 Con el fin de preparar un anticuerpo monoclonal de la presente invención utilizando inmunización con ADN, primero, se administra un ADN que expresa una proteína GPC3 a un animal que va a inmunizarse. El ADN que codifica GPC3 se puede sintetizar por métodos conocidos, tales como PCR. El ADN obtenido se inserta en un vector de expresión apropiado, y luego se administra a un animal para ser inmunizado. Preferiblemente, los vectores de expresión utilizados incluyen, por ejemplo, vectores de expresión disponibles comercialmente, tales como pCDNA3.1. Los vectores pueden administrarse a un organismo utilizando métodos convencionales. Por ejemplo, la inmunización con ADN se realiza utilizando una pistola de genes para introducir partículas de oro recubiertas con vectores de expresión en las células del cuerpo de un animal que se va a inmunizar. Los anticuerpos que reconocen GPC3 también pueden producirse mediante los métodos descritos en el documento WO 2003/104453.

Después de inmunizar a un mamífero como se ha descrito anteriormente, se confirma un aumento en el título de un anticuerpo de unión a GPC3 en el suero. Luego, las células inmunes son recogidas del mamífero y después se

someten a fusión celular. En particular, los esplenocitos se utilizan preferiblemente como células inmunes.

Una célula de mieloma de mamífero se utiliza como una célula para fusionarse con el inmunocito mencionado anteriormente. Las células de mieloma comprenden preferiblemente un marcador de selección adecuado para la identificación sistemática. Un marcador de selección confiere características a las células para su supervivencia (o muerte) en una condición de cultivo específica. La deficiencia de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (de en esta memoria en adelante abreviada como deficiencia de HGPRT) y la deficiencia de timidina quinasa (en lo sucesivo abreviada como deficiencia de TK) se conocen como marcadores de selección. Las células con deficiencia de HGPRT o TK tienen sensibilidad a la hipoxantina aminopterina y timidina (en adelante abreviada como sensibilidad a HAT). Las células sensibles a HAT no pueden sintetizar ADN en un medio de selección de HAT y, por lo tanto, se eliminan. Sin embargo, cuando las células se fusionan con células normales, pueden continuar la síntesis de ADN utilizando la vía de recuperación de las células normales y, por lo tanto, pueden crecer incluso en el medio de selección con HAT.

Las células deficientes en HGPRT y deficientes en TK pueden seleccionarse en un medio que contiene 6-tioguanina, 8-azaguanina (en lo sucesivo abreviado como 8AG), o 5'-bromodeoxiuridina, respectivamente. Las células normales se destruyen puesto que incorporan estos análogos de pirimidina en su ADN. Mientras tanto, las células que son deficientes en estas enzimas pueden sobrevivir en el medio de selección, ya que no pueden incorporar estos análogos de pirimidina. Además, un marcador de selección denominado resistencia a G418 proporcionado por el gen resistente a neomicina confiere resistencia a los antibióticos 2-deoxistreptamina (análogos de la gentamicina). Se conocen varios tipos de células de mieloma que son adecuadas para la fusión celular.

Por ejemplo, pueden utilizarse preferiblemente células de mieloma que incluyen las siguientes células:
 P3 (P3x63Ag8.653) (*J. Immunol.* (1979) 123 (4), 1548-1550);
 P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7);
 NS-1 (*C. Eur. J. Immunol.* (1976)6 (7), 511-519);
 MPC-11 (*Cell* (1976) 8 (3), 405-415);
 SP2/0 (*Nature* (1978) 276 (5685), 269-270);
 FO (*J. Immunol. Methods* (1980) 35 (1-2), 1-21);
 S194/5.XX0.BU.1 (*J. Exp. Med.* (1978) 148 (1), 313-323);
 R210 (*Nature* (1979) 277 (5692), 131-133), etc.

Las fusiones celulares entre los inmunocitos y las células de mieloma se llevan a cabo esencialmente utilizando métodos conocidos, por ejemplo, un método de Kohler y Milstein *et al.* (*Methods Enzymol.* (1981) 73:3-46).

Más específicamente, la fusión celular se puede llevar a cabo, por ejemplo, en un medio de cultivo convencional en presencia de un agente promotor de la fusión celular. Los agentes promotores de la fusión incluyen, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) y virus Sendai (HVJ). Si es necesario, también se añade una sustancia auxiliar, tal como dimetilsulfóxido para mejorar la eficiencia de la fusión.

La relación de inmunocitos a células de mieloma puede determinarse a criterio propio, preferiblemente, por ejemplo, una célula de mieloma por cada uno de cada diez inmunocitos. Los medios de cultivo a utilizar en fusiones celulares incluyen, por ejemplo, medios que son adecuados para el cultivo de estirpes celulares de mieloma, tales como medio RPMI1640 y medio MEM, y otros medios de cultivo convencionales utilizados para este tipo de cultivo celular. Además, los suplementos de suero tales como suero fetal bovino (SFB) se pueden añadir preferiblemente al medio de cultivo.

Para la fusión celular, las cantidades predeterminadas de las células inmunes anteriores y las células de mieloma se mezclan bien en el medio de cultivo anterior. Luego, se añade una solución de PEG (por ejemplo, el peso molecular promedio es de aproximadamente 1.000 a 6.000) precalentada a aproximadamente 37 °C a una concentración de generalmente 30 % a 60 % (p/v). Esto se mezcla suavemente para producir las células de fusión deseadas (hibridomas). Acto seguido, un medio de cultivo apropiado mencionado anteriormente se añade gradualmente a las células, y este se centrifuga repetidamente para eliminar el sobrenadante. Por consiguiente, se pueden eliminar los agentes de fusión celular y aquellos que son desfavorables para el cultivo del hibridoma.

Los hibridomas así obtenidos pueden seleccionarse por cultivo utilizando un medio selectivo convencional, por ejemplo, medio con HAT (un medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). Las células distintas de los hibridomas deseados (células no fusionadas) pueden destruirse continuando el cultivo en el medio con HAT anterior durante un periodo de tiempo suficiente. Normalmente, el periodo dura varios días a varias semanas. Luego, los hibridomas que producen el anticuerpo deseado se identifican sistemáticamente y se clonan individualmente mediante métodos de dilución limitante convencionales.

Los hibridomas así obtenidos pueden seleccionarse utilizando un medio de selección basado en el marcador de selección que posee el mieloma utilizado para la fusión celular. Por ejemplo, las células deficientes en HGPRT o TK pueden seleccionarse mediante cultivo utilizando el medio con HAT (un medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). Específicamente, cuando se utilizan células de mieloma sensibles a HAT para la fusión celular, las células fusionadas con éxito con células normales pueden proliferar selectivamente en el medio con HAT.

Las células distintas de los hibridomas deseados (células no fusionadas) pueden destruirse continuando el cultivo en el medio con HAT anterior durante un periodo de tiempo suficiente. Específicamente, los hibridomas deseados pueden seleccionarse por cultivo durante generalmente desde varios días hasta varias semanas. Luego, los hibridomas que producen el anticuerpo deseado se identifican sistemáticamente y se clonan individualmente mediante métodos de dilución limitante convencionales.

Los anticuerpos deseados pueden seleccionarse preferiblemente y clonarse individualmente mediante métodos de identificación sistemática basándose en una reacción conocida antígeno/anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de unión a GPC3 puede unirse a GPC3 expresada en la superficie celular. Dicho anticuerpo monoclonal puede seleccionarse por clasificación de células activadas por fluorescencia (CCAF). CCAF es un sistema que evalúa la unión de un anticuerpo a la superficie celular mediante el análisis de las células en contacto con un anticuerpo fluorescente utilizando un rayo láser y la medición de la fluorescencia emitida por las células individuales.

Para identificar sistemáticamente hibridomas que producen un anticuerpo monoclonal de la presente invención por CCAF, primero se preparan células que expresan GPC3. Las células utilizadas preferiblemente para la identificación sistemática son células de mamíferos en las que GPC3 se expresa de manera forzada. Como control, la actividad de un anticuerpo para unirse a GPC3 de la superficie celular puede detectarse selectivamente utilizando células de mamífero no transformadas como células huésped. Específicamente, los hibridomas que producen un anticuerpo monoclonal anti-GPC3 pueden aislarse seleccionando hibridomas que producen un anticuerpo que se une a las células forzadas a expresar GPC3, pero no a las células huésped.

Alternativamente, la actividad de un anticuerpo para unirse a las células que expresan GPC3 inmovilizadas puede evaluarse basándose en el principio de ELISA. Por ejemplo, las células que expresan GPC3 se inmovilizan en los pocillos de una placa ELISA. Los sobrenadantes de cultivo de hibridomas se ponen en contacto con las células inmovilizadas en los pocillos y se detectan anticuerpos que se unen a las células inmovilizadas. Cuando los anticuerpos monoclonales se derivan del ratón, los anticuerpos unidos a las células pueden detectarse utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón. Los hibridomas que producen un anticuerpo deseado que tiene la capacidad de unión al antígeno se seleccionan mediante la identificación sistemática anterior, y se pueden clonar mediante un método de dilución limitante o similar.

Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales así preparados pueden pasarse a un medio de cultivo convencional y almacenarse en nitrógeno líquido durante un largo periodo.

Los hibridomas anteriores se cultivan mediante un método convencional, y los anticuerpos monoclonales deseados se pueden preparar a partir de los sobrenadantes de cultivo. Alternativamente, los hibridomas se administran y cultivan en mamíferos compatibles, y los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de la ascitis. El primer método es adecuado para preparar anticuerpos con alta pureza.

También se pueden utilizar preferiblemente anticuerpos codificados por genes de anticuerpos que se clonan a partir de células productoras de anticuerpos, tales como los hibridomas anteriores. Un gen de anticuerpo clonado se inserta en un vector apropiado, y este se introduce en un huésped para expresar el anticuerpo codificado por el gen. Los métodos para aislar genes de anticuerpos, insertar los genes en vectores y transformar células huésped ya se han establecido, por ejemplo, por Vandamme *et al.* (*Eur. J. Biochem.* (1990) 192(3), 767-775). Los métodos para producir anticuerpos recombinantes también se conocen como se describe a continuación.

Por ejemplo, un ADNc que codifica la región variable (región V) de un anticuerpo anti-GPC3 se prepara a partir de células de hibridoma que expresan el anticuerpo anti-GPC3. Para este fin, el ARN total se extrae primero de los hibridomas. Los métodos utilizados para extraer los ARNm de las células incluyen, por ejemplo:

- el método de ultracentrifugación con guanidina (*Biochemistry* (1979) 18 (24), 5294-5299) y
- el método AGPC (*Anal. Biochem.* (1987) 162(1), 156-159).

Los ARNm extraídos se pueden purificar utilizando el kit de purificación de ARNm (GE Healthcare Bioscience) o similares. Alternativamente, los kits para extraer el total directamente de las células, tales como el kit de purificación de ARNm QuickPrep (GE Healthcare Bioscience), también están disponibles comercialmente. Los ARNm pueden prepararse a partir de hibridomas utilizando tales kits. Los ADNc que codifican la región V del anticuerpo pueden sintetizarse a partir de los ARNm preparados utilizando una transcriptasa inversa. Los ADNc se pueden sintetizar utilizando el kit de síntesis de ADNc de primera cadena de transcriptasa inversa AMV (Seikagaku Co.) o similares. Además, el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech) y el método PCR-based 5'-RACE (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85(23), 8998-9002; *Nucleic Acids Res.* (1989) 17(8), 2919-2932) pueden utilizarse apropiadamente para sintetizar y amplificar ADNcs. En tal proceso de síntesis de ADNc, los sitios de enzimas de restricción apropiados descritos a continuación pueden introducirse en ambos extremos de un ADNc.

El fragmento de ADNc de interés se purifica a partir del producto de PCR resultante, y luego se liga a un vector de ADN. De este modo, se construye un vector recombinante y se introduce en *E. coli* o similares. Después de la selección de colonias, el vector recombinante deseado puede prepararse a partir de los *E. coli* formadores de colonias. Luego, si el vector recombinante tiene la secuencia de nucleótidos de ADNc de interés se somete a ensayo mediante un método conocido, como el método de terminación de cadena didesoxinucleótido.

El método 5'-RACE que utiliza cebadores para amplificar el gen de la región variable se utiliza convenientemente para aislar el gen que codifica la región variable. Primero, se construye una biblioteca de ADNc 5'-RACE mediante síntesis de ADNc utilizando ARN extraídos de células de hibridoma como plantilla. Un kit disponible comercialmente, como el kit de amplificación de ADNc SMART RACE, se utiliza adecuadamente para sintetizar la biblioteca de ADNc 5'-RACE.

El gen del anticuerpo se amplifica por PCR utilizando la biblioteca de ADNc 5'-RACE preparada como plantilla. Los cebadores para amplificar el gen de anticuerpo de ratón pueden diseñarse basándose en secuencias génicas de anticuerpo conocidas. Las secuencias de nucleótidos de los cebadores varían en función de la subclase de inmunoglobulina. Por lo tanto, es preferible que la subclase se determine de antemano utilizando un kit disponible comercialmente, tal como kit de isotipado del anticuerpo monoclonal de ratón Iso Strip (Roche Diagnostics).

Específicamente, por ejemplo, los cebadores que permiten la amplificación de los genes que codifican las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$ y $\gamma 3$ y las cadenas ligeras κ y λ se utilizan para aislar genes que codifican IgG de ratón. En general, un cebador que se hibrida en un sitio de región constante cercano a la región variable se utiliza como cebador del lado 3' para amplificar un gen de región variable de IgG. Mientras tanto, se utiliza un cebador fijado a un kit de construcción de biblioteca de ADNc 5' RACE como cebador del lado 5'.

Los productos de PCR así amplificados se utilizan para remodelar inmunoglobulinas compuestas de una combinación de cadenas pesadas y ligeras. Un anticuerpo deseado puede seleccionarse utilizando la actividad de unión a GPC3 de una inmunoglobulina remodelada como indicador. Por ejemplo, cuando el objetivo es aislar un anticuerpo contra GPC3, es más preferido que la unión del anticuerpo a GPC3 sea específica. Un anticuerpo de unión a GPC3 se puede identificar sistemáticamente, por ejemplo, mediante las siguientes etapas:

- (1) poner en contacto una célula que expresa GPC3 con un anticuerpo que comprende la región V codificada por un ADNc aislado de un hibridoma;
- (2) detectar la unión del anticuerpo a la célula que expresa GPC3; y
- (3) seleccionar un anticuerpo que se une a la célula que expresa GPC3.

Se conocen métodos para detectar la unión de un anticuerpo a células que expresan GPC3. Específicamente, la unión de un anticuerpo a las células que expresan GPC3 puede detectarse mediante las técnicas descritas anteriormente, tales como CCAF. Las muestras inmovilizadas de células que expresan GPC3 se utilizan apropiadamente para evaluar la actividad de unión de un anticuerpo.

Los métodos de identificación sistemática de anticuerpos preferidos que utilizan la actividad de unión como un indicador también incluyen métodos de pegado y lavado con vectores de fagos. Los métodos de identificación sistemática que utilizan vectores de fagos son ventajosos cuando los genes de anticuerpos se aíslan de bibliotecas de subclases de cadena pesada y de cadena ligera de una población celular que expresa anticuerpos policlonales. Los genes que codifican las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera se pueden vincular mediante una secuencia enlazadora adecuada para formar un Fv de cadena sencilla (scFv). Los fagos que presentan scFv en su superficie pueden producirse insertando un gen que codifica scFv en un vector de fago. Los fagos se ponen en contacto con un antígeno de interés. Entonces, un ADN que codifica scFv que tiene la actividad de unión de interés puede aislarse recogiendo fagos unidos al antígeno. Este proceso se puede repetir según sea necesario para enriquecer scFv que tiene la actividad de unión de interés.

Después del aislamiento del ADNc que codifica la región V del anticuerpo anti-GPC3 de interés, el ADNc se digiere con enzimas de restricción que reconocen los sitios de restricción introducidos en ambos extremos del ADNc. Las enzimas de restricción preferidas reconocen y escinden una secuencia de nucleótidos que se produce en la secuencia de nucleótidos del gen del anticuerpo a baja frecuencia. Además, un sitio de restricción para una enzima que produce un extremo pegajoso se introduce preferiblemente en un vector para insertar un fragmento digerido de una única copia en la orientación correcta. El ADNc que codifica la región V del anticuerpo anti-GPC3 se digiere como se ha descrito anteriormente, y se inserta en un vector de expresión apropiado para construir un vector de expresión de anticuerpo. En este caso, si un gen que codifica la región constante del anticuerpo (región C) y un gen que codifica la región V anterior se fusionan en el marco, se obtiene un anticuerpo quimérico. En esta memoria, "anticuerpo quimérico" significa que el origen de la región constante es diferente del de la región variable. Por consiguiente, además de los anticuerpos heterociméricos de ratón/humano, se incluyen anticuerpos aloquiméricos humano/humano en los anticuerpos quiméricos de la presente invención. Se puede construir un vector de expresión de anticuerpo quimérico insertando el gen de la región V anterior en un vector de expresión que ya tiene la región constante. Específicamente, por ejemplo, una secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción que escinde el gen de la región V anterior puede colocarse apropiadamente en el lado 5' de un vector de expresión que lleva un ADN que codifica una región constante del anticuerpo deseado (región C). Se construye un vector de expresión de anticuerpo quimérico fusionando en el marco los dos genes digeridos con la misma combinación de enzimas de restricción.

Para producir un anticuerpo monoclonal anti-GPC3, los genes de anticuerpos se insertan en un vector de expresión, de modo que los genes se expresan bajo el control de una región reguladora de la expresión. La región reguladora de la expresión para la expresión de anticuerpos incluye, por ejemplo, potenciadores y promotores. Además, se

puede fijar una secuencia de señal apropiada al extremo amino terminal, de modo que el anticuerpo expresado se secreta en el exterior de las células. En los Ejemplos descritos a continuación, se utiliza un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos MGWSCILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 72) como una secuencia de señal. Mientras tanto, pueden fijarse otras secuencias de señal apropiadas. El polipéptido expresado se escinde en el extremo carboxilo terminal de la secuencia anterior, y el polipéptido resultante se secreta en el exterior de las células como un polipéptido maduro. Luego, las células huésped apropiadas se transforman con el vector de expresión, y se obtienen las células recombinantes que expresan el ADN que codifica el anticuerpo anti-GPC3.

Los ADN que codifican la cadena pesada del anticuerpo (cadena P) y la cadena ligera (cadena L) se insertan por separado en diferentes vectores de expresión para expresar el gen del anticuerpo. Una molécula de anticuerpo que tiene las cadenas P y L puede expresarse co-transfectando la misma célula huésped con vectores en los que se insertan los genes de la cadena P y la cadena L respectivamente. Alternativamente, las células huésped pueden transformarse con un único vector de expresión en el que se insertan los ADN que codifican las cadenas P y L (véase el documento WO 94/11523).

Hay varias combinaciones conocidas de células huésped/vector de expresión para la preparación de anticuerpos mediante la introducción de genes de anticuerpos aislados en huéspedes apropiados. Todos estos sistemas de expresión son aplicables al aislamiento de los dominios de unión a antígeno y los dominios de unión a CD3 de la presente invención. Las células eucariotas apropiadas utilizadas como células huésped incluyen células de animales, células vegetales y células fúngicas. Específicamente, las células de animales incluyen, por ejemplo, las siguientes células.

- (1) células de mamífero: CHO, COS, mieloma, renales de hámster recién nacido (BHK), HeLa, Vero, o similares;
- (2) células de anfibios: ovocitos de *Xenopus*, o similares; y
- (3) células de insecto: sf9, sf21, Tn5, o similares.

Además, como célula vegetal, se conoce un sistema de expresión génica de anticuerpos que utiliza células derivadas del género *Nicotiana*, tal como *Nicotiana tabacum*. Las células cultivadas con callo pueden utilizarse apropiadamente para transformar células vegetales.

Además, las siguientes células se pueden utilizar como células fúngicas:
 levaduras: el género *Saccharomyces*, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, y el género *Pichia*, tal como *Pichia pastoris*; y
 hongos filamentosos: el género *Aspergillus*, tal como *Aspergillus niger*.

Además, también se conocen sistemas de expresión génica de anticuerpos que utilizan células procarióticas. Por ejemplo, cuando se utilizan células bacterianas, células de *E. coli*, células de *Bacillus subtilis*, y similares se pueden utilizar adecuadamente. Los vectores de expresión que llevan los genes de anticuerpos de interés se introducen en estas células mediante transfección. Las células transfectadas se cultivan *in vitro*, y el anticuerpo deseado puede prepararse a partir del cultivo de células transformadas.

Además de las células huésped descritas anteriormente, los animales transgénicos también pueden utilizarse para producir un anticuerpo recombinante. Es decir, el anticuerpo se puede obtener de un animal en el que se introduce el gen que codifica el anticuerpo de interés. Por ejemplo, el gen del anticuerpo puede construirse como un gen de fusión insertándolo en el marco de un gen que codifica una proteína producida específicamente en la leche. La β -caseína de cabra o similares se puede utilizar, por ejemplo, como la proteína secretada en la leche. Los fragmentos de ADN que contienen el gen fusionado insertado con el gen del anticuerpo se inyectan en un embrión de cabra, y luego este embrión se introduce en una cabra. Los anticuerpos deseados se pueden obtener como una proteína fusionada con la proteína de leche de la leche producida por la cabra transgénica nacida de la cabra receptora del embrión (o de su progenie). Además, para aumentar el volumen de leche que contiene el anticuerpo deseado producido por la cabra transgénica, se pueden administrar hormonas a la cabra transgénica según sea necesario (Ebert, K. M. *et al.*, *Bio/Technology* (1994) 12 (7), 699-702).

Cuando un complejo de polipéptidos descrito en esta memoria se administra a humanos, un dominio de unión a antígeno derivado de un anticuerpo genéticamente recombinante que se ha modificado artificialmente para reducir la antigenicidad heteróloga contra humanos y similares, se puede utilizar adecuadamente como el dominio de unión a antígeno del complejo. Tales anticuerpos genéticamente recombinantes incluyen, por ejemplo, anticuerpos humanizados. Estos anticuerpos modificados se producen apropiadamente por métodos conocidos.

Una región variable de anticuerpo utilizada para producir el dominio de unión a antígeno de un complejo polipeptídico descrito en esta memoria está generalmente formada por tres regiones determinantes de complementariedad (RDC) que están separadas por cuatro regiones marco (FRs). RDC es una región que determina esencialmente la especificidad de unión de un anticuerpo. Las secuencias de aminoácidos de las RDC son muy diversas. Por otra parte, las secuencias de aminoácidos que forman FR suelen tener una alta identidad incluso entre anticuerpos con diferentes especificidades de unión. Por lo tanto, en general, la especificidad de unión de un cierto anticuerpo puede introducirse en otro anticuerpo mediante un injerto de RDC.

Un anticuerpo humanizado también se denomina un anticuerpo humano remodelado. Específicamente, se conocen anticuerpos humanizados preparados injertando la RDC de un anticuerpo animal no humano tal como un anticuerpo de ratón a un anticuerpo humano y similares. También se conocen técnicas comunes de modificación por ingeniería genética para obtener anticuerpos humanizados. Específicamente, por ejemplo, la PCR de extensión por solapamiento se conoce como un método para injertar una RDC de anticuerpo de ratón en una FR humana. En la PCR de extensión por solapamiento, se añade una secuencia de nucleótidos que codifica una RDC de anticuerpo de ratón a injertar a los cebadores para sintetizar una FR humana de anticuerpo. Los cebadores se preparan para cada una de las cuatro FR. En general, se considera que cuando se injerta una RDC de ratón en una FR humana, seleccionar una FR humana que tenga una alta identidad en una FR de ratón es ventajoso para mantener la función de RDC. Es decir, generalmente es preferible utilizar una FR humana que comprenda una secuencia de aminoácidos que tenga una alta identidad con la secuencia de aminoácidos de la FR adyacente a la RDC de ratón que se va a injertar.

Las secuencias de nucleótidos a ligar se diseñan de manera que se conecten entre sí en el marco. Las FR humanas se sintetizan individualmente utilizando los cebadores respectivos. Como resultado, se obtienen productos en los que el ADN codificante de RDC de ratón está fijado a los ADN codificantes de FR individuales. Las secuencias de nucleótidos que codifican la RDC de ratón de cada producto se diseñan de modo que se solapen entre sí. Luego, se lleva a cabo la reacción de síntesis de la hebra complementaria para hibridar las regiones RDC superpuestas de los productos sintetizados utilizando un gen de anticuerpo humano como plantilla. Las FR humanas se ligan en las secuencias de RDC de ratón mediante esta reacción.

El gen de la región V de longitud completa, en el que se ligan finalmente tres RDC y cuatro FR, se amplifica utilizando cebadores que se hibridan en su extremo 5' o 3', que se añaden con secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción adecuadas. Se puede producir un vector de expresión para el anticuerpo humanizado insertando el ADN obtenido como se ha descrito anteriormente y un ADN que codifica una región C del anticuerpo humano en un vector de expresión de modo que se ligan en el marco. Después de que el vector recombinante se transfecta en un huésped para establecer células recombinantes, las células recombinantes se cultivan y el ADN que codifica el anticuerpo humanizado se expresa para producir el anticuerpo humanizado en el cultivo celular (véase, la publicación de patente europea n.º EP 239400 y la publicación de patente internacional n.º WO 1996/002576).

Al medir y evaluar cualitativa o cuantitativamente la actividad de unión a antígeno del anticuerpo humanizado producido como se ha descrito anteriormente, se puede seleccionar adecuadamente las FR de anticuerpos humanos que permiten que las RDC formen un sitio de unión a antígeno favorable cuando se ligan a través de las RDC. Los residuos de aminoácidos en las FR pueden sustituirse según sea necesario, de modo que las RDC de un anticuerpo humano remodelado forman un sitio de unión a antígeno apropiado. Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones de secuencia de aminoácidos en las FR aplicando el método de PCR utilizado para injertar una RDC de ratón en una FR humana. Más específicamente, se pueden introducir mutaciones parciales de la secuencia de nucleótidos en los cebadores que se hibridan en la FR. Las mutaciones de secuencias de nucleótidos se introducen en las FR sintetizadas mediante el uso de dichos cebadores. Las secuencias FR mutantes que tienen las características deseadas pueden seleccionarse midiendo y evaluando la actividad del anticuerpo mutante sustituido con aminoácido para unirse al antígeno mediante el método mencionado anteriormente (Sato, K. *et al.*, *Cancer Res.* (1993) 53: 851-856).

Alternativamente, los anticuerpos humanos deseados pueden obtenerse inmunizando animales transgénicos que tienen todo el repertorio de genes de anticuerpos humanos (véanse los documentos WO 1993/012227; WO 1992/003918; WO 1994/002602; WO 1994/025585; WO 1996/034096; WO 1996/033735) por inmunización con ADN.

Además, también se conocen técnicas para preparar anticuerpos humanos por pegado y lavado utilizando bibliotecas de anticuerpos humanos. Por ejemplo, la región V de un anticuerpo humano se expresa como un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) en la superficie del fago mediante el método de expresión en fagos. Se pueden seleccionar los fagos que expresan un scFv que se une al antígeno. La secuencia de ADN que codifica la región V del anticuerpo humano que se une al antígeno se puede determinar analizando los genes de los fagos seleccionados. Se determina la secuencia de ADN del scFv que se une al antígeno. Se prepara un vector de expresión fusionando la secuencia de la región V en marco con la secuencia de la región C de un anticuerpo humano deseado, e insertándolo en un vector de expresión apropiado. El vector de expresión se introduce en las células apropiadas para la expresión como las descritas anteriormente. El anticuerpo humano se puede producir expresando el gen que codifica el anticuerpo humano en las células. Estos métodos ya son conocidos (véanse los documentos WO 1992/001047; WO 1992/020791; WO 1993/006213; WO 1993/011236; WO 1993/019172; WO 1995/001438; WO 1995/015388).

Dominio de unión a antígeno

En esta memoria, "dominio de unión a antígeno" se refiere a una porción de anticuerpo que comprende una región que se une específicamente y es complementaria a la totalidad o a una porción de un antígeno. Cuando el peso molecular de un antígeno es grande, un anticuerpo sólo puede unirse a una porción particular del antígeno. La porción particular se llama "epítipo". Se puede proporcionar un dominio de unión a antígeno a partir de uno o más

dominios variables de anticuerpo. Preferiblemente, los dominios de unión a antígeno contienen tanto la región variable de cadena ligera (VL) del anticuerpo como la región variable de cadena pesada (VP) del anticuerpo. Dichos dominios de unión a antígeno preferibles incluyen, por ejemplo, "Fv de cadena sencilla (scFv)", "anticuerpo de cadena sencilla", "Fv", "Fv2 de cadena sencilla (scFv2)", "Fab" y "F(ab')₂".

- 5 Los dominios de unión a antígeno de los complejos polipeptídicos de la presente invención pueden unirse al mismo epítipo. El epítipo puede estar presente en una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 4. Alternativamente, los dominios de unión a antígeno de complejos polipeptídicos de la presente invención pueden unirse individualmente a diferentes epítopos. El epítipo puede estar presente en una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 4.

10 Especificidad

"Específico" significa que una molécula que se une específicamente a una o más parejas de unión no muestra ninguna unión significativa a otras moléculas aparte de las parejas. Además, "específico" también se utiliza cuando un dominio de unión a antígeno es específico de un epítipo particular de múltiples epítopos contenidos en un antígeno. Cuando un epítipo unido por un dominio de unión a antígeno está contenido en múltiples antígenos diferentes, un complejo polipeptídico que contiene el dominio de unión a antígeno puede unirse a varios antígenos que tienen el epítipo.

Antígeno

En esta memoria, no existe ninguna limitación particular sobre el antígeno, y es posible utilizar cualquier antígeno excepto para CD3. Tales antígenos incluyen, por ejemplo, receptores, antígenos de cáncer, antígenos de CMH y antígenos de diferenciación. Los receptores incluyen, por ejemplo, aquellos que pertenecen a la familia del receptor del factor de crecimiento hematopoyético, familia del receptor de citoquinas, familia del receptor de tirosina quinasa, familia del receptor de serina/treonina quinasa, familia del receptor del TNF, familia del receptor acoplado a la proteína G, familia del receptor anclado a GPI, familia de receptor de tirosina fosfatasa, familia de factor de adhesión y familia de receptor de hormonas. Los receptores que pertenecen a estas familias de receptores y sus características se describen en varios documentos, por ejemplo, revisiones tales como Cooke BA., King RJB., van der Molen HJ. ed. *New Comprehensive Biochemistry* vol. 18B "Hormones and their Actions Part II" págs. 1-46 (1988) Elsevier Science Publishers BV.; y SAIBO KOGAKU (Cell Technology) *Supplementary Volume Handbook Series "Secchaku Inshi Handbook (Handbook for Adhesion factors)"* M. Miyasaka Ed. (1994) Shujunsha, Tokio, Japón; y Patthy (*Cell* (1990) 61(1), 13-14); Ullrich *et al.*, (*Cell* (1990) 61(2), 203-212); Massagué (*Cell* (1992) 69(6), 1067-1070); Miyajima *et al.*, (*Annu. Rev. Immunol.* (1992) 10, 295-331); Taga *et al.*, (*FASEB J.* (1992) 6, 3387-3396); Fantl *et al.*, (*Annu. Rev. Biochem.* (1993), 62, 453-481), Smith *et al.*, (*Cell* (1994) 76(6) 959-962), Flower DR. *Biochim. Biophys Acta*, Flower (*Biochim. Biophys Acta* (1999) 1422(3) 207-234.

Específicamente, los receptores que pertenecen a las familias de receptores anteriores incluyen preferiblemente, por ejemplo, receptores de eritropoyetina (EPO) humanos y de ratón (*Blood* (1990) 76(1), 31-35; *Cell* (1989) 57(2), 277-285), receptores del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humanos y de ratón (*Proc. Natl Acad Sci. USA.* (1990) 87(22), 8702-8706; mG-CSFR, *Cell* (1990) 61(2), 341-350), receptores de trombopoyetina (TPO) humana y de ratón (*Proc. Natl Acad Sci. USA.* (1992) 89(12), 5640-5644; *EMBO J.* (1993) 12(7), 2645-53), receptores de insulina humana y de ratón (*Nature* (1985) 313(6005), 756-761), receptores de ligando Flt-3 humano y de ratón (*Proc. Natl Acad Sci. USA.* (1994) 91(2), 459-463), receptores de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) humano y de ratón (*Proc. Natl Acad Sci. USA.* (1988) 85(10), 3435-3439), receptores de interferón (IFN)- α y - β humano y de ratón (*Cell* (1990) 60(2), 225-234; y *Cell* (1994) 77(3), 391-400), receptores de leptina humana y de ratón, receptores de hormona de crecimiento (GH) humano y de ratón, receptores de interleucina (IL)-10 humano y de ratón, receptores de factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) humano y de ratón, receptores del factor inhibidor de la leucemia (LIF) humano y de ratón, y receptores del factor neurotrófico ciliar (CNTF) humano y de ratón.

Los antígenos del cáncer son antígenos que se expresan a medida que las células se vuelven malignas y también se les llama "antígenos específicos de tumores" Además, las cadenas anormales de azúcar que se expresan en la superficie celular o en las moléculas de proteínas cuando las células se vuelven cancerosas también son antígenos cancerosos, y se denominan "antígeno de carbohidratos asociados con el cáncer". Tales antígenos del cáncer incluyen, por ejemplo, GPC3 (*Int J Cancer.* (2003) 103(4), 455-65), EpCAM (*Proc. Natl Acad Sci. USA.* (1989) 86(1), 27-31), EGFR, CA19-9, CA15-3, y sialil SSEA-1 (SLX). GPC3 pertenece a la familia de receptores anclados a GPI mencionada anteriormente y se expresa en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de hígado. EpCAM se expresa en múltiples tipos de cáncer, incluido el cáncer de pulmón, y sus secuencias de polinucleótidos y polipéptidos se describen en los números de acceso a RefSeq NM_002354.2 (SEQ ID NO: 3) y NP_002345.2 (SEQ ID NO: 4), respectivamente).

En general, los antígenos de CMH se clasifican en antígenos del CMH de clase I y clase II. Los antígenos del CMH de clase I incluyen HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G y -H, mientras que los antígenos del CMH de clase II incluyen HLA-DR, -DQ y -DP.

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

Epítopo

"Epítopo" significa un determinante antigénico en un antígeno, y se refiere a un sitio de antígeno al que se une el dominio de unión a antígeno de un complejo polipeptídico descrito en esta memoria. Así, por ejemplo, el epítopo se puede definir según su estructura. Alternativamente, el epítopo se puede definir según la actividad de unión a antígeno de un complejo polipeptídico que reconoce el epítopo. Cuando el antígeno es un péptido o polipéptido, el epítopo puede ser especificado por los residuos de aminoácidos que forman el epítopo. Alternativamente, cuando el epítopo es una cadena de azúcar, el epítopo puede ser especificado por su estructura específica de cadena de azúcar.

Un epítopo lineal es un epítopo que contiene un epítopo cuya secuencia de aminoácidos primaria es reconocida. Un epítopo lineal de este tipo contiene normalmente al menos tres y lo más comúnmente al menos cinco, por ejemplo, aproximadamente 8 a 10 o 6 a 20 aminoácidos en su secuencia específica.

En contraste con el epítopo lineal, "epítopo conformacional" es un epítopo en el que la secuencia de aminoácidos primaria que contiene el epítopo no es el único determinante del epítopo reconocido (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos primaria de un epítopo conformacional no es reconocida necesariamente por un anticuerpo que define el epítopo). Los epítomos conformacionales pueden contener un mayor número de aminoácidos en comparación con los epítomos lineales. Un anticuerpo que reconoce el epítopo conformacional reconoce la estructura tridimensional de un péptido o proteína. Por ejemplo, cuando una molécula de proteína se pliega y forma una estructura tridimensional, los aminoácidos y/o las cadenas principales de los polipéptidos que forman un epítopo conformacional se alinean, y el epítopo se hace reconocible por el anticuerpo. Los métodos para determinar las conformaciones de epítomos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear bidimensional, marcaje del sitio específico con espín y resonancia paramagnética electrónica, pero no están limitados a estos. Véase, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology* (1996), vol. 66, Morris (ed.).

Los ejemplos de un método para evaluar la unión del epítopo por un complejo polipeptídico de ensayo que contiene un dominio de unión al antígeno GPC3 se describen a continuación. Según los ejemplos a continuación, los métodos para evaluar la unión del epítopo por un complejo polipeptídico de ensayo que contiene un dominio de unión a antígeno para un antígeno distinto a GPC3, también pueden realizarse de manera apropiada.

Por ejemplo, si un complejo polipeptídico de ensayo que contiene un dominio de unión a antígeno GPC3 reconoce un epítopo lineal en la molécula GPC3, se puede confirmar, por ejemplo, como se menciona a continuación. Un péptido lineal que comprende una secuencia de aminoácidos que forma el dominio extracelular de GPC3 se sintetiza para el fin anterior. El péptido puede sintetizarse químicamente, u obtenerse mediante técnicas de modificación por ingeniería genética utilizando una región que codifica la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio extracelular en un ADNc de GPC3. Luego, un complejo polipeptídico de ensayo que contiene un dominio de unión a antígeno GPC3 se evalúa por su actividad de unión hacia un péptido lineal que comprende la secuencia de aminoácidos que forma el dominio extracelular. Por ejemplo, un péptido lineal inmovilizado puede utilizarse como un antígeno mediante ELISA para evaluar la actividad de unión del complejo polipeptídico hacia el péptido. Alternativamente, la actividad de unión hacia un péptido lineal puede evaluarse basándose en el nivel en que el péptido lineal inhibe la unión del complejo polipeptídico a células que expresan GPC3. Estos ensayos pueden demostrar la actividad de unión del complejo polipeptídico hacia el péptido lineal.

Si un complejo polipeptídico de ensayo que contiene un dominio de unión a antígeno GPC3 reconoce un epítopo conformacional se puede evaluar de la siguiente manera. Las células que expresan GPC3 se preparan para el fin anterior. Se puede determinar que un complejo polipeptídico de ensayo que contiene un dominio de unión a antígeno GPC3 reconoce un epítopo conformacional cuando se une fuertemente a las células que expresan GPC3 al contacto, pero no se une esencialmente a un péptido lineal inmovilizado que comprende una secuencia de aminoácidos que forma el dominio extracelular de GPC3. En esta memoria, "no se une esencialmente" significa que la actividad de unión es del 80 % o menos, generalmente del 50 % o menos, preferiblemente del 30 % o menos, y particularmente preferiblemente del 15 % o menos en comparación con la actividad de unión hacia células que expresan GPC3 humana.

Los métodos para analizar la actividad de unión de un complejo polipeptídico de ensayo que contiene un dominio de unión a antígeno GPC3 hacia células que expresan GPC3 incluyen, por ejemplo, los métodos descritos en *Antibodies: A Laboratory Manual* (Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 359-420). Específicamente, la evaluación se puede realizar en base al principio de ELISA o clasificación celular activada por fluorescencia (CCAF) utilizando células que expresan GPC3 como antígeno.

En el formato ELISA, la actividad de unión de un complejo polipeptídico de ensayo que contiene un dominio de unión a antígeno GPC3 hacia células que expresan GPC3 puede evaluarse cuantitativamente comparando los niveles de señal generados por la reacción enzimática. Específicamente, se añade un complejo polipeptídico de ensayo a una placa ELISA en la que se inmovilizan las células que expresan GPC3. Luego, el complejo polipeptídico de ensayo unido a las células se detecta utilizando un anticuerpo marcado con enzimas que reconoce el complejo polipeptídico de ensayo. Alternativamente, cuando se utiliza CCAF, se prepara una serie de dilución de un complejo de polipéptido de ensayo, y se puede determinar el título de unión del anticuerpo para las células que expresan GPC3 para comparar la actividad de unión del complejo polipeptídico de ensayo hacia las células que expresan GPC3.

La unión de un complejo polipeptídico de ensayo hacia un antígeno expresado en la superficie de las células suspendidas en un tampón o similar puede detectarse utilizando un citómetro de flujo. Los citómetros de flujo conocidos incluyen, por ejemplo, los siguientes dispositivos:

FACSCanto™ II

FACSAria™

FACSArray™

FACSVantage™ SE

FACSCalibur™ (todos son nombres comerciales de BD Biosciences)

EPICS ALTRA HyPerSort

Cytomics FC 500

EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC

Cell Lab Quanta/Cell Lab Quanta SC (todos son nombres comerciales de Beckman Coulter).

Los métodos preferibles para ensayar la actividad de unión de un complejo polipeptídico de ensayo que contiene un dominio de unión a antígeno GPC3 hacia un antígeno incluyen, por ejemplo, el siguiente método. Primero, las células que expresan GPC3 reaccionan con un complejo polipeptídico de ensayo, y luego se tiñen con un anticuerpo secundario marcado con FITC que reconoce el complejo polipeptídico. El complejo polipeptídico de ensayo se diluye apropiadamente con un tampón adecuado para preparar el complejo a una concentración deseada. Por ejemplo, el complejo se puede utilizar a una concentración dentro del intervalo de 10 µg/ml a 10 ng/ml. Luego, la intensidad de la fluorescencia y el recuento celular se determinan utilizando FACSCalibur (BD). La intensidad de fluorescencia obtenida mediante análisis utilizando el software CELL QUEST (BD), es decir, el valor de la media geométrica, refleja la cantidad de anticuerpo unido a las células. Es decir, la actividad de unión de un complejo polipeptídico de ensayo, que se representa por la cantidad del complejo polipeptídico de ensayo unido, puede determinarse midiendo el valor de la media geométrica.

Si un complejo polipeptídico de ensayo que contiene un dominio de unión a antígeno GPC3 comparte un epítipo común con otro complejo polipeptídico se puede evaluar en base a la competencia entre los dos complejos por el mismo epítipo. La competencia entre complejos polipeptídicos puede detectarse mediante un ensayo de bloqueo cruzado o similar. Por ejemplo, el ensayo ELISA competitivo es un ensayo de bloqueo cruzado preferido.

Específicamente, en el ensayo de bloqueo cruzado, la proteína GPC3 inmovilizada en los pocillos de una placa de microtitulación se pre-incuba en presencia o ausencia de un complejo polipeptídico competidor candidato, y luego se añade al mismo un complejo polipeptídico de ensayo. La cantidad de complejo polipeptídico de ensayo unido a la proteína GPC3 en los pocillos se correlaciona indirectamente con la capacidad de unión de un complejo polipeptídico competidor candidato que compite por la unión al mismo epítipo. Es decir, cuanto mayor sea la afinidad del complejo polipeptídico competidor por el mismo epítipo, menor será la actividad de unión del complejo polipeptídico de ensayo hacia los pocillos recubiertos con proteína GPC3.

La cantidad del complejo polipeptídico de ensayo unido a los pocillos a través de la proteína GPC3 se puede determinar fácilmente marcando el complejo polipeptídico por adelantado. Por ejemplo, un complejo polipeptídico marcado con biotina se mide utilizando un conjugado de avidina/peroxidasa y un sustrato apropiado. En particular, el ensayo de bloqueo cruzado que utiliza marcadores enzimáticos tales como la peroxidasa se denomina "ensayo de ELISA competitivo". El complejo polipeptídico también puede marcarse con otras sustancias marcadoras que permiten la detección o la medición. Específicamente, se conocen radiomarcadores, etiquetas fluorescentes y similares.

Cuando el complejo polipeptídico competidor candidato puede bloquear la unión mediante un complejo polipeptídico de ensayo que contiene un dominio de unión a antígeno GPC3 en al menos 20 %, preferiblemente al menos 20 a 50 %, y más preferiblemente al menos 50 % en comparación con la actividad de unión en un experimento de control realizado en ausencia del complejo polipeptídico competidor, se determina que el complejo polipeptídico de ensayo se une esencialmente al mismo epítipo unido por el complejo polipeptídico competidor, o compite por la unión al mismo epítipo.

Cuando ya se ha identificado la estructura de un epítipo unido por un complejo polipeptídico de ensayo que contiene un dominio de unión a antígeno GPC3, se puede evaluar si los complejos polipeptídico de ensayo y control comparten un epítipo común al comparar las actividades de unión de los dos complejos polipeptídicos hacia un péptido preparado mediante la introducción de mutaciones de aminoácidos en el péptido que forma el epítipo.

Para medir las actividades de unión anteriores, por ejemplo, las actividades de unión de los complejos polipeptídicos de ensayo y control hacia un péptido lineal en el que se introduce una mutación se comparan en el formato ELISA anterior. Además de los métodos de ELISA, la actividad de unión hacia el péptido mutante unido a una columna se puede determinar haciendo fluir complejos polipeptídicos de ensayo y control en la columna, y luego cuantificando el complejo polipeptídico eluido en la solución de elución. Se conocen métodos para adsorber un péptido mutante a una columna, por ejemplo, en forma de un péptido de fusión GST.

Alternativamente, cuando el epítipo identificado es un epítipo conformacional, se puede evaluar si los complejos polipeptídicos de ensayo y control comparten un epítipo común mediante el siguiente método. En primer lugar, se preparan células que expresan GPC3 y células que expresan GPC3 con una mutación introducida en el epítipo. Los complejos polipeptídicos de ensayo y control se añaden a una suspensión celular preparada suspendiendo estas células en un tampón apropiado, tal como TFS. Luego, las suspensiones celulares se lavan adecuadamente con un tampón, y se añaden a las mismas un anticuerpo marcado con FITC que reconoce los complejos polipeptídicos de ensayo y control. La intensidad de la fluorescencia y el número de células teñidas con el anticuerpo marcado se determinan utilizando FACSCalibur (BD). Los complejos polipeptídicos de ensayo y control se diluyen apropiadamente utilizando un tampón adecuado y se utilizan en las concentraciones deseadas. Por ejemplo, pueden utilizarse en una concentración dentro del intervalo de 10 µg/ml a 10 ng/ml. La intensidad de fluorescencia determinada por análisis utilizando el software CELL QUEST (BD), es decir, el valor de la media geométrica, refleja la cantidad de anticuerpo marcado unido a las células. Es decir, las actividades de unión de los complejos polipeptídicos de ensayo y control, que están representados por la cantidad de anticuerpo marcado, pueden determinarse midiendo el valor de la media geométrica.

En el método anterior, si un complejo polipeptídico "no se une esencialmente a células que expresan GPC3 mutante" puede evaluarse, por ejemplo, mediante el siguiente método. Primero, los complejos polipeptídicos de ensayo y control unidos a células que expresan GPC3 mutante se tiñen con un anticuerpo marcado. Luego, se determina la intensidad de fluorescencia de las células. Cuando se utiliza FACSCalibur para la detección de fluorescencia por citometría de flujo, la intensidad de fluorescencia determinada se puede analizar utilizando el software CELL QUEST. A partir de los valores de la media geométrica en presencia y ausencia del complejo polipeptídico, el valor de comparación (Δ Media-Geo) se puede calcular según la siguiente fórmula para determinar la relación de aumento de la intensidad de fluorescencia como resultado de la unión por el complejo polipeptídico.

Δ Media-Geo = Media-Geo en presencia del complejo polipeptídico / Media-Geo (en ausencia del complejo polipeptídico)

El valor de comparación de la media geométrica (valor Δ Media-Geo para la molécula de GPC3 mutante) determinado por el análisis anterior, que refleja la cantidad de un complejo polipeptídico de ensayo unido a células que expresan GPC3 mutante, se compara con el valor de comparación de Δ Media-Geo que refleja la cantidad del complejo polipeptídico de ensayo unido a células que expresan GPC3. En este caso, las concentraciones del complejo polipeptídico de ensayo utilizado para determinar los valores de comparación de Δ Media-Geo para las células que expresan GPC3 y las células que expresan GPC3 mutante se ajustan de manera particularmente preferible para que sean iguales o esencialmente iguales. Un complejo polipeptídico que se ha confirmado que reconoce un epítipo en GPC3 se utiliza como un complejo polipeptídico de control.

Si el valor de comparación Δ Media-Geo de un complejo polipeptídico de ensayo para células que expresan GPC3 mutante es menor que el valor de comparación Δ Media-Geo del complejo polipeptídico de ensayo para células que expresan GPC3 en al menos un 80 %, preferiblemente un 50 %, más preferiblemente un 30 %, y particularmente de manera preferible 15 %, entonces el complejo polipeptídico de ensayo "no se une esencialmente a células que expresan GPC3 mutante". La fórmula para determinar el valor Media Geo (Media Geométrica) se describe en la Guía del Usuario del Software CELL QUEST (BD biosciences). Cuando la comparación muestra que los valores de comparación son esencialmente equivalentes, se puede determinar que el epítipo para los complejos polipeptídicos de ensayo y control es el mismo.

Fragmento variable (Fv)

En esta memoria, la expresión "fragmento variable (Fv)" se refiere a la unidad mínima de un dominio de unión a antígeno derivado de anticuerpo que está compuesto por un par de la región variable de cadena ligera (VL) del anticuerpo y la región variable de cadena pesada (VP) del anticuerpo. En 1988, Skerra y Pluckthun descubrieron que pueden prepararse anticuerpos homogéneos y activos a partir de la fracción de periplasma de *E. coli* insertando un gen de anticuerpo corriente abajo de una secuencia de señal bacteriana e induciendo la expresión del gen en *E. coli* (*Science* (1988) 240(4855), 1038-1041). En el Fv preparado a partir de la fracción de periplasma, VP se asocia con VL de una manera que se une a un antígeno.

En esta memoria, Fv incluye preferiblemente, por ejemplo, un par de Fv que es un complejo polipeptídico o similar que comprende:

(1) un dominio de unión a antígeno bivalente que es un scFv bivalente, en donde un scFv monovalente del scFv bivalente está vinculado a un polipéptido formando un dominio Fc por un fragmento Fv de cadena pesada que forma

un dominio de unión a CD3, y el otro scFv monovalente está vinculado al otro polipéptido que forma un dominio Fc por un fragmento Fv de cadena ligera que forma un dominio de unión a CD3;

(2) un dominio que comprende un dominio Fc que no tiene actividad de unión al receptor Fcγ, y que se deriva de aminoácidos que forman el dominio Fc de IgG1, IgG2a, IgG3 o IgG4; y

5 (3) al menos un dominio de unión a CD3 monovalente,

en donde los fragmentos Fv de cadena ligera y de cadena pesada se asocian para formar un dominio de unión a CD3 de modo que puede unirse al antígeno CD3.

scFv, anticuerpo de cadena sencilla y sc(Fv)2

10 En esta memoria, los términos "scFv", "anticuerpo de cadena sencilla" y "sc(Fv)2" se refieren a un fragmento de anticuerpo de una única cadena polipeptídica que contiene regiones variables derivadas de las cadenas pesada y ligera, pero no de la región constante. En general, un anticuerpo de cadena sencilla también contiene un enlazador polipeptídico entre los dominios VP y VL, que permite la formación de una estructura deseada que se cree que permite la unión al antígeno. El anticuerpo de cadena sencilla se discute en detalle por Pluckthun en "*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore, eds., Springer-Verlag, Nueva York, 269-315

15 (1994)". Véase también la publicación de patente internacional WO 1988/001649; las patentes de Estados Unidos n.º 4.946.778 y 5.260.203. En una realización particular, el anticuerpo de cadena sencilla puede ser biespecífico y/o humanizado.

scFv es un dominio de unión a antígeno en el que VP y VL que forma Fv están unidos entre sí por un enlazador peptídico (*Proc. Natl Acad Sci. USA.* (1988) 85(16), 5879-5883). El enlazador peptídico puede retener VP y VL en proximidad inmediata.

20

sc(Fv)2 es un anticuerpo de cadena sencilla en el que cuatro regiones variables de dos VL y dos VP están vinculadas por enlazadores, tales como los enlazadores peptídicos, para formar una cadena sencilla (*J Immunol. Methods* (1999) 231(1-2), 177-189). Las dos VP y dos VL pueden derivarse de diferentes anticuerpos monoclonales. Dicho sc(Fv)2 incluye preferiblemente, por ejemplo, un sc(Fv)2 biespecífico que reconoce dos epítomos presentes en un único antígeno como se describe en *Journal of Immunology* (1994) 152(11), 5368-5374. sc(Fv)2 puede producirse por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, sc(Fv)2 puede producirse vinculando scFv mediante un enlazador, tal como un enlazador peptídico.

25

En esta memoria, la forma de un dominio de unión a antígeno que forma un sc(Fv)2 incluye un anticuerpo en el que las dos unidades VP y las dos unidades VL están dispuestas en el orden de VP, VL, VP y VL ([VH]-enlazador-[VL]-enlazador-[VP]-enlazador-[VL]) a partir del extremo N-terminal de un polipéptido de cadena sencilla. El orden de las dos unidades VP y las dos unidades VL no se limita a la forma anterior, y se pueden disponer en cualquier orden. El orden de ejemplo de la forma se enumera a continuación.

30

[VL]-enlazador-[VP]-enlazador-[VH]-enlazador-[VL]
 [VP]-enlazador-[VL]-enlazador-[VL]-enlazador-[VP]
 35 [VP]-enlazador-[VP]-enlazador-[VL]-enlazador-[VL]
 [VL]-enlazador-[VL]-enlazador-[VP]-enlazador-[VP]
 [VL]-enlazador-[VP]-enlazador-[VL]- enlazador-[VP]

La forma molecular de sc(Fv)2 también se describe en detalle en el documento WO 2006/132352. Según estas descripciones, los expertos en la técnica pueden preparar apropiadamente el sc(Fv)2 deseado para producir los complejos polipeptídicos descritos en esta memoria.

40

Además, los complejos polipeptídicos de la presente invención pueden conjugarse con un polímero portador, tal como PEG o un compuesto orgánico, tal como un agente anti-cancerígeno. Alternativamente, una secuencia de adición de cadena de azúcar se inserta preferiblemente en los complejos polipeptídicos de modo que la cadena de azúcar produzca un efecto deseado.

45 Los enlazadores que se utilizarán para vincular las regiones variables de un anticuerpo comprenden enlazadores peptídicos arbitrarios que pueden introducirse mediante modificación por ingeniería genética, enlazadores sintéticos y enlazadores descritos, por ejemplo, en *Protein Engineering*, 9(3), 299-305, 1996. Sin embargo, los enlazadores peptídicos son preferidos en la presente invención. La longitud de los enlazadores peptídicos no está particularmente limitada, y puede ser seleccionada adecuadamente por los expertos en la técnica según el fin. La longitud es preferiblemente de cinco aminoácidos o más (sin limitación particular, el límite superior es generalmente de 30 aminoácidos o menos, preferiblemente de 20 aminoácidos o menos), y particularmente de manera preferible de 15 aminoácidos. Cuando sc(Fv)2 contiene tres enlazadores peptídicos, su longitud puede ser igual o diferente.

50

Por ejemplo, dichos enlazadores peptídicos incluyen:

55 Ser
 Gly Ser
 Gly Gly Ser
 Ser Gly Gly

- Gly Gly Gly Ser (SEQ ID NO: 5)
 Ser Gly Gly Gly (SEQ ID NO: 6)
 Gly Gly Gly Gly Ser (SEQ ID NO: 7)
 Ser Gly Gly Gly Gly (SEQ ID NO: 8)
 5 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser (SEQ ID NO: 9)
 Ser Gly Gly Gly Gly Gly (SEQ ID NO: 10)
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser (SEQ ID NO: 11)
 Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly (SEQ ID NO: 12)
 10 (Gly Gly Gly Gly Ser (SEQ ID NO: 7))_n
 (Ser Gly Gly Gly Gly (SEQ ID NO: 8))_n
 en donde n es un número entero de 1 o mayor. Los expertos en la técnica pueden seleccionar la longitud o las secuencias de los enlazadores peptídicos en función del fin.

Los enlazadores sintéticos (agentes de reticulación química) se utilizan de forma rutinaria para reticular péptidos, y por ejemplo:

- 15 N-hidroxisuccinimida (NHS),
 suberato de disuccinimidilo (DSS),
 bis(sulfosuccinimidil) suberato (BS³),
 ditiobis(succinimidil propionato) (DSP),
 20 ditiobis(sulfosuccinimidil propionato) (DTSSP),
 etilenglicol bis(succinimidil succinato) (EGS),
 etilenglicol bis(sulfosuccinimidil succinato) (sulfo-EGS),
 disuccinimidil tartrato (DST), disufosuccinimidil tartrato (sulfo-DST),
 bis[2-(succinimidoxicarbonilo)etil] sulfona (BSOCOES),
 y bis[2-(sulfosuccinimidoxicarbonilo)etil] sulfona (sulfo-BSOCOES). Estos agentes de reticulación están disponibles
 25 comercialmente.

En general, se requieren tres enlazadores para vincular entre sí cuatro regiones variables de anticuerpos. Los enlazadores que se utilizarán pueden ser del mismo tipo o tipos diferentes.

Fab, F(ab')₂, y Fab'

- 30 "Fab" consiste en una única cadena ligera y un dominio CH1 y una región variable de una única cadena pesada. La cadena pesada de la molécula Fab no puede formar enlaces disulfuro con otra molécula de cadena pesada.

- "F(ab')₂" o "Fab" se produce al tratar una inmunoglobulina (anticuerpo monoclonal) con una proteasa tal como pepsina y papaína, y se refiere a un fragmento de anticuerpo generado al digerir una inmunoglobulina (anticuerpo monoclonal) cerca de enlaces disulfuro presentes entre las regiones de bisagra en cada una de las dos cadenas P. Por ejemplo, la papaína escinde IgG corriente arriba de los enlaces disulfuro presentes entre las regiones de bisagra
 35 en cada una de las dos cadenas P para generar dos fragmentos de anticuerpos homólogos, en los que una cadena L comprende VL (región variable de la cadena L) y CL (región constante de la cadena L) está vinculada a un fragmento de la cadena P que comprende VP (región variable de la cadena P) y CHγ1 (región γ1 en una región constante de la cadena P) a través de un enlace disulfuro en sus regiones C-terminales. Cada uno de estos dos fragmentos de anticuerpos homólogos se denomina Fab'.

- 40 "F(ab')₂" consiste en dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que comprenden la región constante de un dominio CH1 y una porción de dominios CH2, de modo que se forman enlaces disulfuro entre las dos cadenas pesadas. El F(ab')₂ que forma un complejo polipeptídico descrito en esta memoria puede producirse preferiblemente de la siguiente manera. Un anticuerpo monoclonal completo o similar que comprende un dominio de unión a antígeno deseado se digiere parcialmente con una proteasa, tal como pepsina; y los fragmentos de Fc se eliminan
 45 por adsorción en una columna de proteína A. La proteasa no está particularmente limitada, siempre que pueda escindir el anticuerpo completo de una manera selectiva para producir F(ab')₂ bajo una condición de reacción enzimática de configuración apropiada, tal como pH. Tales proteasas incluyen, por ejemplo, pepsina y ficina.

Dominio Fc

- 50 Un dominio Fc que forma un complejo polipeptídico descrito en esta memoria puede producirse preferiblemente de la siguiente manera. Un anticuerpo tal como un anticuerpo monoclonal se digiere parcialmente con una proteasa, tal como pepsina. Luego, el fragmento resultante se adsorbe en una columna de proteína A o proteína G, y se eluye con un tampón de elución apropiado. La proteasa no está particularmente limitada, siempre y cuando pueda escindir anticuerpos tales como anticuerpos monoclonales bajo una condición de reacción enzimática de configuración apropiada, tal como pH. Tales proteasas incluyen, por ejemplo, pepsina y ficina.

- 55 Los complejos polipeptídicos descritos en esta memoria comprenden un dominio Fc con actividad de unión al receptor Fcγ reducida, que incluye aminoácidos que forman el dominio Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

El isotipo del anticuerpo se determina según la estructura de la región constante.

Las regiones constantes de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 se denominan Cy1, Cy2, Cy3 y Cy4, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos del dominio Fc que forman Cy1, Cy2, Cy3 y Cy4 humano se ejemplifican en la SEQ ID NO: 23, 24, 25 y 26, respectivamente. La relación entre los residuos de aminoácidos que forman cada secuencia de aminoácidos y la numeración de la UE de Kabat (también denominada en esta memoria ÍNDICE DE LA UE) se muestran en la Fig. 18.

El dominio Fc se refiere a la región además de F(ab')₂ que comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que comprenden una porción de la región constante que comprende un dominio CH1 y una región entre los dominios CH1 y CH2 para que se formen enlaces disulfuro entre las dos cadenas pesadas. El dominio Fc que forma un complejo polipeptídico descrito en esta memoria se puede producir preferiblemente de la siguiente manera. Un anticuerpo monoclonal IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o similar se digiere parcialmente con una proteasa, tal como pepsina, seguido de la elución de la fracción adsorbida en una columna de proteína A. La proteasa no está particularmente limitada, siempre que pueda escindir el anticuerpo completo de una manera selectiva para producir F(ab')₂ en una condición de reacción enzimática de configuración apropiada, tal como pH. Tales proteasas incluyen, por ejemplo, pepsina y ficina.

Receptor Fcy

El receptor Fcy se refiere a un receptor capaz de unirse al dominio Fc de los anticuerpos monoclonales IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, e incluye a todos los miembros que pertenecen a la familia de proteínas esencialmente codificadas por un gen receptor de Fcy. En humanos, la familia incluye FcyRI (CD64) que incluye las isoformas FcyRIa, FcyRIb y FcyRIc; FcyRII (CD32) que incluye las isoformas FcyRIIa (incluido el alotipo H131 y R131), FcyRIIb (que incluye FcyRIIb-1 y FcyRIIb-2) y FcyRIIc; y FcyRIII (CD16) que incluye la isoforma FcyRIIIa (incluido el alotipo V158 y F158) y FcyRIIIb (incluido el alotipo FcyRIIIb-NA1 y FcyRIIIb-NA2); así como todas las FcyRs no identificadas humanas FcyRs, FcyR, y sus alotipos. Sin embargo, el receptor Fcy no se limita a estos ejemplos. Sin quedar limitado a ello, FcyR incluye aquellos derivados de humanos, ratones, ratas, conejos y monos. FcyR puede derivarse de cualquier organismo. El FcyR de ratón incluye, sin quedar limitado a, FcyRI (CD64), FcyRII (CD32), FcyRIII (CD16) y FcyRIII-2 (CD16-2), así como todas las isoformas de ratón no identificadas FcyRs, FcyR y sus alotipos. Dichos receptores Fcy preferidos incluyen, por ejemplo, Fcyl humano (CD64), FcyIIA (CD32), FcyIIB (CD32), FcyIIIA (CD16) y/o FcyIIIB (CD16). La secuencia de polinucleótidos y la secuencia de aminoácidos de Fcyl se muestran en las SEQ ID NOs: 13 (NM_000566.3) y 14 (NP_000557.1), respectivamente; la secuencia de polinucleótidos y la secuencia de aminoácidos de FcyIIA se muestran en las SEQ ID NOs: 15 (BC020823.1) y 16 (AAH20823.1), respectivamente; la secuencia de polinucleótidos y la secuencia de aminoácidos de FcyIIB se muestran en las SEQ ID NOs: 17 (BC146678.1) y 18 (AAI46679.1), respectivamente; la secuencia de polinucleótidos y la secuencia de aminoácidos de FcyIIIA se muestran en las SEQ ID NOs: 19 (BC033678.1) y 20 (AAH33678.1), respectivamente; y la secuencia de polinucleótidos y la secuencia de aminoácidos de FcyIIIB se muestran en las SEQ ID NOs: 21 (BC128562.1) y 22 (AAI28563.1), respectivamente (el número de acceso a RefSeq se muestra en cada paréntesis). Si un receptor Fcy tiene actividad de unión al dominio Fc de un anticuerpo monoclonal IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, se puede evaluar mediante ALPHA screen (Ensayo Homogéneo de Proximidad Luminiscente Amplificada), el método BIACORE basado en resonancia de plasmón de superficie (RPS) y otros (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2006) 103(11), 4005-4010, además de los formatos CCAF y ELISA descritos anteriormente.

Mientras tanto, "ligando Fc" o "ligando efector" se refiere a una molécula y preferiblemente a un polipéptido que se une a un dominio Fc del anticuerpo, formando un complejo de ligando Fc/Fc. La molécula puede ser derivada de cualquier organismo. La unión de un ligando de Fc a Fc induce preferiblemente una o más funciones efectoras. Dichos ligandos de Fc incluyen, pero no se limitan a, receptores de Fc, FcyR, FcaR, FceR, FcRn, C1q y C3, lectina de unión a manano, receptor de manosa, proteína A de *Staphylococcus*, proteína G de *Staphylococcus*, y FcyR virales. Los ligandos de Fc también incluyen homólogos del receptor de Fc (FcRH) (Davis *et al.*, (2002) *Immunological Reviews* 190, 123-136), que son una familia de receptores de Fc homólogos a FcyR. Los ligandos de Fc también incluyen moléculas no identificadas que se unen a Fc.

Actividad de unión al receptor Fcy

La actividad de unión alterada del dominio Fc en cualquiera de los receptores Fcy, Fcyl, FcyIIA, FcyIIB, FcyIIIA y/o FcyIIIB puede evaluarse utilizando los formatos CCAF y ELISA descritos anteriormente, así como ALPHA screen (Ensayo Homogéneo de Proximidad Luminiscente Amplificada) y el método BIACORE basado en resonancia de plasmón superficial (RPS) (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2006) 103(11), 4005-4010).

ALPHA screen se realiza mediante la tecnología ALPHA basándose en el principio que se describe a continuación, utilizando dos tipos de perlas: perlas donantes y aceptadoras. Una señal luminiscente se detecta sólo cuando las moléculas vinculadas a las perlas donantes interactúan biológicamente con las moléculas vinculadas a las perlas aceptadoras y cuando las dos perlas están ubicadas muy cerca. Excitado por el rayo láser, el fotosensibilizador en una perla donante convierte el oxígeno alrededor de la perla en oxígeno singlete excitado. Cuando el oxígeno singlete se dispersa alrededor de las perlas del donante y alcanza las perlas aceptadoras ubicadas muy cerca, se induce una reacción quimioluminiscente dentro de las perlas aceptadoras. Esta reacción finalmente resulta en la emisión de luz. Si las moléculas vinculadas a las perlas del donante no interactúan con las moléculas vinculadas a las perlas aceptadoras, el oxígeno singlete producido por las perlas donantes no alcanza las perlas aceptadoras y no se produce

una reacción quimioluminiscente.

Por ejemplo, un complejo polipeptídico marcado con biotina se inmoviliza en las perlas donantes y el receptor Fc γ marcado con glutatión S-transferasa (GST) se inmoviliza en las perlasceptoras. En ausencia de un complejo polipeptídico que comprende un dominio Fc mutante competitivo, el receptor Fc γ interactúa con un complejo polipeptídico que comprende un dominio Fc de tipo silvestre, induciendo una señal de 520 a 620 nm como resultado. El complejo polipeptídico que tiene un dominio Fc mutante no marcado compite con el complejo polipeptídico que comprende un dominio Fc de tipo silvestre para la interacción con el receptor Fc γ . La afinidad de unión relativa se puede determinar cuantificando la reducción de la fluorescencia como resultado de la competencia. Se conocen métodos para biotilar los complejos polipeptídicos tales como anticuerpos que utilizan sulfo-NHS-biotina o similares. Los métodos apropiados para añadir la etiqueta GST a un receptor Fc γ incluyen métodos que involucran la fusión de polipéptidos que codifican Fc γ y GST en marco, que expresan el gen fusionado utilizando células introducidas con un vector que lleva el gen, y luego se purifican utilizando una columna de glutatión. La señal inducida se puede analizar preferiblemente, por ejemplo, ajustándose a un modelo de competencia de un sitio basado en un análisis de regresión no lineal que utiliza un software, tal como GRAPHPAD PRISM (GraphPad; San Diego).

Una de las sustancias para observar su interacción está inmovilizada como un ligando en la capa delgada de oro de un chip sensor. Cuando se proyecta luz en la superficie trasera del chip sensor para que se produzca una reflexión total en la interfaz entre la capa delgada de oro y el vidrio, la intensidad de la luz reflejada se reduce parcialmente en un sitio determinado (señal de RPS). La otra sustancia para observar su interacción se inyecta como un analito en la superficie del chip sensor. La masa de la molécula de ligando inmovilizada aumenta cuando el analito se une al ligando. Esto altera el índice de refracción del disolvente en la superficie del chip sensor. El cambio en el índice de refracción provoca un cambio posicional de la señal RPS (a la inversa, la disociación desplaza la señal a la posición original). En el sistema Biacore, la cantidad de desplazamiento descrita anteriormente (es decir, el cambio de masa en la superficie del chip sensor) se representa en el eje vertical y, por lo tanto, el cambio de masa a lo largo del tiempo se muestra como datos medidos (sensograma). Los parámetros cinéticos (constante de velocidad de asociación (k_a) y constante de velocidad de disociación (k_d)) se determinan a partir de la curva del sensograma, y la afinidad (KD) se determina a partir de la relación entre estas dos constantes. El ensayo de inhibición se utiliza preferiblemente en los métodos BIACORE. Ejemplos de dicho ensayo de inhibición se describen en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2006) 103(11), 4005-4010.

En esta memoria, "la actividad de unión al receptor Fc γ se reduce" significa, por ejemplo, que, según el método de análisis descrito anteriormente, la actividad competitiva de un complejo polipeptídico de ensayo es 50 % o menos, preferiblemente 45 % o menos, 40 % o menos, 35 % o menos, 30 % o menos, 20 % o menos, o 15 % o menos, y particularmente de manera preferible 10 % o menos, 9 % o menos, 8 % o menos, 7 % o menos, 6 % o menos, 5 % o menos, 4 % o menos, 3 % o menos, 2 % o menos, o 1 % o menos que la actividad competitiva de un complejo polipeptídico de control.

Los complejos polipeptídicos que comprenden el dominio Fc de un anticuerpo monoclonal IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 se pueden utilizar apropiadamente como complejos polipeptídicos de control. Las estructuras del dominio Fc se muestran en las SEQ ID NOs: 23 (A se añade al extremo N-terminal del número de acceso a RefSeq AAC82527.1), 24 (A se añade al extremo N-terminal del número de acceso a RefSeq AAB59393.1), 25 (A se añade al extremo N-terminal del número de acceso a RefSeq CAA27268.1), y 26 (A se añade al extremo N-terminal del número de acceso a RefSeq AAB59394.1). Además, cuando un complejo polipeptídico que comprende un mutante en el dominio Fc de un anticuerpo de un isotipo particular se utiliza como sustancia de ensayo, el efecto de la mutación del mutante en la actividad de unión al receptor Fc γ se evalúa utilizando como control un complejo polipeptídico que comprende un dominio Fc del mismo isotipo. Como se ha descrito anteriormente, los complejos polipeptídico que comprenden un mutante del dominio Fc cuya actividad de unión al receptor Fc γ se ha juzgado como reducida se preparan apropiadamente.

Dichos mutantes conocidos incluyen, por ejemplo, mutantes que tienen una delección de aminoácidos 231A-238S (numeración de la UE) (documento WO 2009/011941), así como mutantes C226S, C229S, P238S, (C220S) (*J. Rheumatol* (2007) 34, 11); C226S y C229S (*Hum. Antibod. Hybridomas* (1990) 1(1), 47-54); C226S, C229S, E233P, L234V y L235A (*Blood* (2007) 109, 1185-1192).

Específicamente, los complejos polipeptídicos preferidos incluyen aquellos que comprenden un dominio Fc con una sustitución del aminoácido en la posición 220, 226, 229, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 264, 265, 266, 267, 269, 270, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 325, 327, 328, 329, 330, 331 o 332 (numeración de la UE) en los aminoácidos que forman el dominio Fc de un anticuerpo de un isotipo particular. El isotipo del anticuerpo a partir del cual se origina el dominio Fc no está particularmente limitado, y es posible utilizar un dominio Fc apropiado derivado de un anticuerpo monoclonal IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Es preferible utilizar dominios Fc derivados de anticuerpos IgG1.

Los complejos polipeptídicos preferidos incluyen, por ejemplo, aquellos que comprenden un dominio Fc que tiene una cualquiera de las sustituciones que se muestran a continuación, cuyas posiciones se especifican según la numeración de la UE (cada número representa la posición de un residuo de aminoácido en la numeración de la UE;

y el símbolo de aminoácido de una letra antes del número representa el residuo de aminoácido antes de la sustitución, mientras que el símbolo de aminoácido de una letra después del número representa el residuo de aminoácido antes de la sustitución) en los aminoácidos que forman el dominio Fc del anticuerpo IgG1:

- 5 (a) L234F, L235E, P331S;
 (b) C226S, C229S, P238S;
 (c) C226S, C229S; o
 (d) C226S, C229S, E233P, L234V, L235A,
 así como aquellos que tienen un dominio Fc que tiene una delección de la secuencia de aminoácidos en las posiciones 231 a 238.

10 Además, los complejos polipeptídicos preferidos también incluyen aquellos que comprenden un dominio Fc que tiene una cualquiera de las sustituciones que se muestran a continuación, cuyas posiciones se especifican según la numeración de la UE en los aminoácidos que forman el dominio Fc de un anticuerpo IgG2:

- (e) H268Q, V309L, A330S, y P331S;
 (f) V234A;
 15 (g) G237A;
 (h) V234A y G237A;
 (i) A235E y G237A; o
 (j) V234A, A235E y G237A. Cada número representa la posición de un residuo de aminoácido en la numeración de la UE; y el símbolo de aminoácido de una letra antes del número representa el residuo de aminoácido antes de la sustitución, mientras que el símbolo de aminoácido de una letra después del número representa el residuo de aminoácido antes de la sustitución.

Además, los complejos polipeptídicos preferidos también incluyen aquellos que comprenden un dominio Fc que tiene una cualquiera de las sustituciones que se muestran a continuación, cuyas posiciones se especifican según la numeración de la UE en los aminoácidos que forman el dominio Fc de un anticuerpo IgG3:

- 25 (k) F241A;
 (l) D265A; o
 (m) V264A. Cada número representa la posición de un residuo de aminoácido en la numeración de la UE; y el símbolo de aminoácido de una letra antes del número representa el residuo de aminoácido antes de la sustitución, mientras que el símbolo de aminoácido de una letra después del número representa el residuo de aminoácido antes de la sustitución.

Además, los complejos polipeptídicos preferidos también incluyen aquellos que comprenden un dominio Fc que tiene una cualquiera de las sustituciones que se muestran a continuación, cuyas posiciones se especifican según la numeración de la UE en los aminoácidos que forman el dominio Fc de un anticuerpo IgG4:

- 35 (n) L235A, G237A, y E318A;
 (o) L235E; o
 (p) F234A y L235A. Cada número representa la posición de un residuo de aminoácido en la numeración de la UE; y el símbolo de aminoácido de una letra antes del número representa el residuo de aminoácido antes de la sustitución, mientras que el símbolo de aminoácido de una letra después del número representa el residuo de aminoácido antes de la sustitución.

40 Los otros complejos polipeptídicos preferidos incluyen, por ejemplo, aquellos que comprenden un dominio Fc en el que cualquier aminoácido en la posición 233, 234, 235, 236, 237, 327, 330 o 331 (numeración de la UE) en los aminoácidos que forman el dominio Fc de un anticuerpo IgG1 se sustituye con un aminoácido de la posición correspondiente en la numeración de la UE en la IgG2 o IgG4 correspondiente.

45 Los complejos polipeptídicos preferidos también incluyen, por ejemplo, aquellos que comprenden un dominio Fc en el que uno o más de los aminoácidos en las posiciones 234, 235 y 297 (numeración de la UE) en los aminoácidos que forman el dominio Fc de un anticuerpo IgG1 es sustituido con otros aminoácidos. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, los complejos polipeptídicos que comprenden un dominio Fc en el que uno cualquiera o más de los aminoácidos en las posiciones 234, 235 y 297 están sustituidos con alanina son particularmente preferidos.

50 Los complejos polipeptídicos preferidos también incluyen, por ejemplo, aquellos que comprenden un dominio Fc en el que un aminoácido en la posición 265 (numeración de la UE) en los aminoácidos que forman el dominio Fc de un anticuerpo IgG1 está sustituido con otro aminoácido. El tipo de aminoácido después de la sustitución no está particularmente limitado; sin embargo, los complejos polipeptídicos que comprenden un dominio Fc en el que un aminoácido en la posición 265 está sustituido con alanina son particularmente preferidos.

55 Dominio Fc derivado de un anticuerpo biespecífico

En esta memoria, los dominios Fc apropiados derivados de anticuerpos biespecíficos también se utilizan como un

dominio Fc con actividad de unión al receptor Fc γ reducida. Un anticuerpo biespecífico es un anticuerpo que tiene dos especificidades diferentes. El anticuerpo biespecífico de tipo IgG puede secretarse a partir de hibridomas híbridos (quadroma) producidos al fusionar dos tipos de hibridomas productores de anticuerpos IgG (Milstein C *et al.*, *Nature* (1983) 305, 537-540).

- 5 Alternativamente, el anticuerpo biespecífico de tipo IgG también puede secretarse introduciendo un total de cuatro genes, los genes de las cadenas L y las cadenas P que forman dos tipos de IgG de interés, en las células y las que la con-expresan. Sin embargo, en teoría, existen diez combinaciones de cadenas P de IgG y cadenas L producidas por tales métodos. Es difícil purificar la IgG que consiste en una combinación deseada de cadena P y cadena L de diez tipos de IgG. Además, en teoría, la cantidad de IgG secretada con una combinación deseada también se reduce significativamente, lo que requiere un cultivo a gran escala. Esto aumenta aún más el costo de producción.

10 En este caso, se puede introducir una sustitución de aminoácido apropiada en el dominio CH3 formando un dominio Fc de la cadena P para secretar preferentemente IgG con una combinación heteróloga de cadenas P. Específicamente, este método se lleva a cabo sustituyendo un aminoácido que tiene una cadena lateral más grande (botón (que significa "protuberancia") con un aminoácido en el dominio CH3 de una de las cadenas P, y sustituyendo un aminoácido que tiene una cadena lateral más pequeña (ojal (que significa "vacío")) con un aminoácido en el dominio CH3 de la otra cadena P, de modo que el botón se coloca en el ojal. Esto promueve la formación de la cadena P heteromérica e inhibe simultáneamente la formación de la cadena P homomérica (documento WO 1996/027011; Ridgway JB *et al.*, *Protein Engineering* (1996) 9, 617-621; Merchant AM *et al.*, *Nature Biotechnology* (1998) 16, 677-681).

20 Por otra parte, con respecto a la cadena L, la región variable de la cadena L es menos polimórfica que la región variable de la cadena P, y por lo tanto, se espera obtener una cadena L común que pueda conferir capacidad de unión a ambas cadenas P. La expresión eficiente de una IgG biespecífica se puede lograr introduciendo los genes de tal cadena L común y dos cadenas P en las células para expresar la IgG (*Nature Biotechnology* (1998) 16, 677-681). Sin embargo, es difícil darse cuenta de esta idea puesto que la probabilidad de que dos tipos de anticuerpos que contienen la misma cadena L se seleccionen al azar es baja. Por consiguiente, se propone un método para seleccionar una cadena L común que muestre una fuerte capacidad de unión a cualquier cadena P diferente (documento WO 2004/065611).

30 Además, también hay técnicas conocidas para producir un anticuerpo biespecífico aplicando métodos para controlar la asociación de polipéptidos, o la asociación de multímeros heterómeros formados por polipéptidos a la asociación entre los dos polipéptidos que forman un dominio Fc. Específicamente, los métodos para controlar la asociación de polipéptidos se pueden emplear para producir un anticuerpo biespecífico (documento WO 2006/106905), en el que los residuos de aminoácidos que forman la interfaz entre dos polipéptidos que forman el dominio Fc se alteran para inhibir la asociación entre los dominios Fc que tienen la misma secuencia y para permitir la formación de complejos polipeptídicos formados por dos dominios Fc de diferentes secuencias.

35 Los dos polipéptidos descritos anteriormente que forman un dominio Fc derivado de un anticuerpo biespecífico pueden utilizarse apropiadamente como un dominio que abarca un dominio Fc de la presente invención. Más específicamente, tales dos polipéptidos preferidos que forman un dominio Fc incluyen aquellos en los que los aminoácidos en las posiciones 349 y 366 (numeración de la UE) en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido son cisteína y triptófano, respectivamente, y los aminoácidos en las posiciones 356, 366, 368 y 407 (numeración de la UE) en la secuencia de aminoácidos del otro polipéptido son cisteína, serina, alanina y valina, respectivamente.

40 En otra realización, los dominios preferidos que abarcan un dominio Fc de la presente invención incluyen dos polipéptidos que forman un dominio Fc, en el que el aminoácido en la posición 409 (numeración de la UE) en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido es ácido aspártico, y el aminoácido en la posición 399 (numeración de la UE) en la secuencia de aminoácidos del otro polipéptido es lisina. En la realización anterior, el aminoácido en la posición 409 puede ser ácido glutámico en lugar de ácido aspártico, mientras que el aminoácido en la posición 399 puede ser arginina en lugar de lisina. Además, el ácido aspártico en la posición 360 o 392 también puede combinarse preferiblemente con lisina en la posición 399.

45 En otra realización, los dominios preferidos que abarcan un dominio Fc de la presente invención incluyen dos polipéptidos que forman un dominio Fc, en el que el aminoácido en la posición 370 (numeración de la UE) en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido es ácido glutámico, y el aminoácido en la posición 357 (numeración de la UE) en la secuencia de aminoácidos del otro polipéptido es lisina.

50 En otra realización más, los dominios preferidos que abarcan un dominio Fc de la presente invención incluyen dos polipéptidos que forman un dominio Fc, en el que el aminoácido en la posición 439 (numeración de la UE) en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido es ácido glutámico, y el aminoácido en la posición 356 (numeración de la UE) en la secuencia de aminoácidos del otro polipéptido es lisina.

55 Además, los dominios preferidos que abarcan un dominio Fc de la presente invención incluyen realizaciones con una combinación de los mismos:

dos polipéptidos que forman un dominio Fc, en los cuales los aminoácidos en las posiciones 409 y 370 (numeración

- de la UE) en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido son ácido aspártico y ácido glutámico, respectivamente, y los aminoácidos en las posiciones 399 y 357 (numeración de la UE) en la secuencia de aminoácidos del otro polipéptido son ambos lisina (en esta realización, el ácido glutámico en la posición 370 puede reemplazarse con ácido aspártico y ácido glutámico en la posición 370 puede reemplazarse con ácido aspártico en la posición 392);
- 5 dos polipéptidos que forman un dominio Fc, en el que los aminoácidos en las posiciones 409 y 439 (numeración de la UE) en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido son ácido aspártico y ácido glutámico, respectivamente, y los aminoácidos en las posiciones 399 y 356 (numeración de la UE) en la secuencia de aminoácidos del otro polipéptido son ambos lisina (en esta realización, la posición del ácido glutámico en 439 puede reemplazarse con ácido aspártico en la posición 360, 392 o 439);
- 10 dos polipéptidos que forman un dominio Fc, en el que los aminoácidos en las posiciones 370 y 439 (numeración de la UE) en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido son ambos ácido glutámico, y los aminoácidos en las posiciones 357 y 356 (numeración de la UE) en la secuencia de aminoácidos del otro polipéptido son ambos lisina; y dos polipéptidos que forman un dominio Fc, en el que los aminoácidos en las posiciones 409, 370 y 439 (numeración de la UE) en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido son ácido aspártico, ácido glutámico y ácido glutámico, respectivamente, y los aminoácidos en las posiciones 399, 357 y 356 (numeración de la UE) en la secuencia de aminoácidos del otro polipéptido son todos lisina (en esta realización, el aminoácido en la posición 370 puede no estar sustituido con ácido glutámico; alternativamente, en lugar de sustituir el aminoácido en la posición 370 con ácido glutámico, el ácido glutámico en la posición 439 puede reemplazarse con ácido aspártico, o el ácido glutámico en la posición 439 puede reemplazarse con ácido aspártico en la posición 392).
- 15 En otra realización, los dominios preferidos que abarcan un dominio Fc de la presente invención incluyen dos polipéptidos que forman un dominio Fc, en el que el aminoácido en la posición 356 (numeración de la UE) en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido es lisina, y los aminoácidos en las posiciones 435 y 439 (numeración de la UE) en la secuencia de aminoácidos del otro polipéptido son arginina y ácido glutámico, respectivamente.
- 20 Cuando los dos polipéptidos descritos anteriormente que forman un dominio Fc derivado de un anticuerpo biespecífico se utilizan como un dominio que abarca un dominio Fc de la presente invención, los dominios de unión a antígeno y/o los dominios de unión a CD3 de la presente invención pueden disponerse en una combinación deseada
- 25

Dominio Fc con heterogeneidad C-terminal reducida

- En esta memoria, los dominios Fc con una heterogeneidad C-terminal del dominio Fc mejorada, además de la característica descrita anteriormente, se utilizan apropiadamente como dominios Fc con actividad de unión al receptor Fcγ reducida. Más específicamente, la presente invención proporciona dominios Fc en los que delecionan glicina y lisina en las posiciones 446 y 447 (numeración de la UE), respectivamente, en las secuencias de aminoácidos de dos polipéptidos que forman un dominio Fc derivado de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
- 30

Dominio de unión al complejo receptor de células T

- En esta memoria, "dominio de unión al complejo receptor de células T" se refiere a una porción de un anticuerpo del complejo receptor de células T, que comprende una región que se une específicamente y es complementaria a la totalidad o a una porción de un complejo receptor de células T. Dicho complejo receptor de células T puede ser el propio receptor de células T, o una molécula adaptadora que junto con el receptor de células T forma el complejo receptor de células T. Un adaptador preferido es CD3.
- 35

Dominio de unión al receptor de células T

- En esta memoria, "dominio de unión al receptor de células T" se refiere a una porción de un anticuerpo receptor de células T, que comprende una región que se une específicamente y es complementaria a la totalidad o a una porción de un receptor de células T.
- 40

- Es posible utilizar la región variable o la región constante de un receptor de células T. Sin embargo, los epítopos preferidos a los que se une un dominio de unión a CD3 son aquellos localizados en la región constante. Las secuencias de la región constante incluyen, por ejemplo, las de la cadena α del receptor de células T (número de acceso a RefSeq CAA26636.1; SEQ ID NO: 67), la cadena β del receptor de células T (número de acceso a RefSeq C25777; SEQ ID NO: 68), cadena γ1 del receptor de células T (número de acceso a RefSeq A26659; SEQ ID NO: 69), cadena γ2 del receptor de células T (número de acceso a RefSeq AAB63312.1; SEQ ID NO: 70) y cadena δ del receptor de células T (número de acceso a RefSeq AAA61033 .1; SEQ ID NO: 71).
- 45

- 50 Dominio de unión a CD3

- En esta memoria, "dominio de unión a CD3" se refiere a una porción de un anticuerpo CD3, que comprende una región que se une específicamente y es complementaria a la totalidad o a una porción de CD3. El dominio de unión a CD3 se puede derivar de uno o más dominios variables de anticuerpos. Preferiblemente, el dominio de unión a CD3 incluye tanto la región variable de la cadena ligera (VL) del anticuerpo CD3 como la región variable de la cadena pesada (VP) del anticuerpo CD3. Dichos dominios de unión a CD3 preferidos incluyen, por ejemplo, "Fv de cadena sencilla (scFv)", "anticuerpo de cadena sencilla", "Fv", "Fv2 de cadena sencilla (scFv2)", "Fab" y "F(ab)2".
- 55

El dominio de unión a CD3 de la presente invención puede unirse a cualquier epítipo, siempre que el epítipo esté ubicado dentro de la secuencia de la cadena γ , la cadena δ o la cadena ϵ formando CD3 humano. En la presente invención, los dominios de unión a CD3 preferidos incluyen aquellos que comprenden una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo CD3 y una región variable de cadena pesada (VP) de anticuerpo CD3, que se unen a un epítipo en el dominio extracelular de la cadena ϵ de un complejo CD3 humano. Dichos dominios de unión a CD3 preferidos incluyen aquellos que comprenden una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo CD3 y una región variable de cadena pesada (VP) de anticuerpo CD3 de anticuerpo OKT3 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1980) 77, 4914-4917) o varios anticuerpos CD3 conocidos. Además, dichos dominios de unión a CD3 apropiados incluyen aquellos derivados de un anticuerpo CD3 con características deseadas, que se obtienen inmunizando un animal deseado con la cadena γ , la cadena δ o la cadena ϵ que forma CD3 humano mediante los métodos descritos anteriormente. Los anticuerpos anti-CD3 apropiados de los que se deriva un dominio de unión a CD3 incluyen anticuerpos humanos y anticuerpos humanizados apropiadamente como se ha descrito anteriormente. Las estructuras de la cadena γ , la cadena δ y la cadena ϵ que forman CD3 se muestran como secuencias de polinucleótidos en SEQ ID NOs: 27 (NM_000073.2), 29 (NM_000732.4) y 31 (NM_000733.3), respectivamente, y como secuencias de polipéptidos en SEQ ID NO: 28 (NP_000064.1), 30 (NP_000723.1) y 32 (NP_000724.1), respectivamente (el número de acceso a RefSeq se muestra entre paréntesis).

Complejo polipeptídico

La estructura de un complejo polipeptídico de la presente invención se define por las reivindicaciones y generalmente contiene

(1) un dominio de unión a antígeno canceroso;
 (2) un dominio que comprende un dominio Fc con una actividad de unión al receptor Fc γ reducida como se define; y
 (3) un dominio de unión al complejo receptor de células T que es un dominio de unión a CD3 como se define.
 Los otros complejos polipeptídicos descritos en esta memoria sirven para entender completamente los antecedentes y el campo de la invención reivindicada, y proporcionar orientación al experto en la técnica si es necesario.

Cada uno de los dominios descritos anteriormente puede estar vinculado directamente a un enlace peptídico. Por ejemplo, (1) F(ab')₂ se utiliza como el dominio de unión a antígeno, y (2) un dominio Fc con actividad reducida de unión al receptor Fc γ se utiliza como el dominio que comprende un dominio Fc con actividad reducida de unión al receptor Fc γ . En este caso, cuando el dominio de unión a antígeno de (1) está vinculado por un enlace peptídico al dominio que comprende un dominio Fc de (2), el polipéptido vinculado forma una estructura de anticuerpo. Dicho anticuerpo puede prepararse purificando los medios de cultivo del hibridoma descrito anteriormente o purificando los medios de cultivo de células huésped deseadas que llevan de manera estable el polinucleótido que codifica el polipéptido formador de anticuerpos.

Generalmente, cuando el dominio de unión a CD3 de (3) está vinculado a la estructura del anticuerpo, el dominio de unión a CD3 puede estar vinculado mediante un enlace peptídico al extremo C-terminal de la región constante de la estructura del anticuerpo. En otra realización, el dominio de unión a CD3 está vinculado por un enlace peptídico al extremo N-terminal de la región variable de la cadena pesada o la región variable de la cadena ligera de la estructura del anticuerpo. En la otra realización, el dominio de unión a CD3 puede estar vinculado por un enlace peptídico al extremo C-terminal de la región constante de la cadena ligera de la estructura del anticuerpo. El dominio de unión a CD3 a vincular puede tener cualquier estructura deseada; sin embargo, tal dominio de unión a CD3 apropiado incluye preferiblemente Fv, y más preferiblemente scFv. La valencia del dominio de unión a CD3 que se une a la estructura del anticuerpo no está limitada. Para vincular un dominio de unión a CD3 divalente a la estructura del anticuerpo, un dominio de unión a CD3 monovalente puede estar vinculado a un enlace peptídico a los respectivos extremos C-terminales de dos dominios Fc que forman la región constante de la estructura del anticuerpo. Alternativamente, para vincular un dominio de unión a CD3 divalente a la estructura del anticuerpo, un scFv divalente (es decir, sc(Fv)₂) puede estar vinculado a un enlace peptídico al término C terminal de uno de los dos dominios Fc. En este caso, el complejo polipeptídico en el que un scFv divalente (es decir, sc(Fv)₂) está vinculado al extremo C-terminal de solo uno de los dos dominios Fc que forman la región constante de la estructura del anticuerpo se produce de manera eficiente utilizando un dominio Fc descrito anteriormente derivado de un anticuerpo biespecífico. Alternativamente, para vincular un dominio de unión a CD3 monovalente a la estructura del anticuerpo, un scFv monovalente puede estar vinculado a un enlace peptídico al extremo C-terminal de uno de los dos dominios Fc. En este caso, un complejo polipeptídico de la presente invención en el que un scFv monovalente está vinculado al extremo C-terminal de solo uno de los dos dominios Fc que forman la región constante de la estructura del anticuerpo se produce de manera eficiente utilizando un dominio Fc descrito anteriormente derivado de un anticuerpo biespecífico.

Además, cuando el dominio de unión a CD3 de (3) está vinculado a un enlace peptídico al extremo C-terminal de la región constante de la estructura del anticuerpo, los complejos polipeptídicos apropiados incluyen aquellos en los que el fragmento Fv de cadena pesada que forma el dominio de unión a CD3 está vinculado al extremo C-terminal de una región constante (dominio CH3) que forma el dominio Fc, y el fragmento Fv de la cadena ligera que forma el dominio de unión a CD3 está vinculado al extremo C-terminal de la otra región constante (dominio CH3) que forma el dominio Fc. En este caso, se inserta un enlazador apropiado tal como Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 7) para vincular el fragmento Fv de la cadena pesada o de la cadena ligera al extremo C-terminal de la región constante

(dominio CH3). El número de repeticiones en el enlazador no está limitado; sin embargo, se selecciona de 1 a 10, preferiblemente de 2 a 8, o más preferiblemente de 2 a 6. Específicamente, es posible insertar un enlazador apropiado en el que el número de repeticiones de [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser] (SEQ ID NO: 7) sea 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

5 Alternativamente, cuando se produce un complejo polipeptídico en el que el fragmento Fv de cadena pesada que forma el dominio de unión a CD3 está vinculado al extremo C-terminal de una región constante (dominio CH3) que forma el dominio Fc y el fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión a CD3 está vinculado al extremo C-terminal de la otra región constante (dominio CH3) que forma el dominio Fc, se pueden utilizar las alteraciones apropiadas de los residuos de aminoácidos que permiten la formación de enlaces disulfuro entre el fragmento Fv de
10 cadena pesada y el fragmento Fv de cadena ligera para potenciar la asociación entre el fragmento Fv de cadena pesada y el fragmento Fv de cadena ligera.

En otra realización, cuando se produce un complejo polipeptídico en el que el fragmento Fv de cadena pesada que forma el dominio de unión a CD3 está vinculado al extremo C-terminal de una región constante (dominio CH3) que forma el dominio Fc y el fragmento Fv de cadena ligera que forma el dominio de unión a CD3 está vinculado al
15 extremo C-terminal de la otra región constante (dominio CH3) que forma el dominio Fc, los dominios CH1 y CL del anticuerpo pueden vincularse a cada uno de los fragmentos Fv de cadena pesada y cada uno de los fragmentos Fv de cadena ligera para potenciar la asociación entre el fragmento Fv de cadena pesada y el fragmento Fv de cadena ligera.

En otra realización, con el fin de vincular un dominio de unión a CD3 divalente a la estructura del anticuerpo, un dominio de unión a CD3 monovalente puede estar vinculado a un enlace peptídico a los respectivos extremos C-
20 terminales de dos regiones constantes de cadena ligera o los respectivos extremos N-terminales de las regiones variables de cadena ligera de la estructura del anticuerpo. Alternativamente, con el fin de vincular un dominio de unión a CD3 divalente a la estructura del anticuerpo, un scFv divalente (es decir, sc(Fv)₂) puede estar vinculado a un enlace peptídico a los respectivos extremos C-terminales de las dos regiones constantes de cadena ligera o los
25 respectivos extremos N-terminales de regiones variables de cadena ligera. En este caso, los complejos polipeptídicos en los que se vincula un scFv divalente (es decir, sc(Fv)₂) al extremo C- o N-terminal de una de las dos regiones variables de cadena ligera de la estructura del anticuerpo pueden producirse de manera eficiente utilizando un dominio Fc descrito anteriormente derivado de un anticuerpo biespecífico. Alternativamente, con el fin
30 de vincular un dominio de unión a CD3 monovalente a la estructura del anticuerpo, un scFv monovalente puede estar vinculado a un enlace peptídico al extremo C- o N-terminal de una de las dos regiones variables de cadena ligera. En este caso, los complejos polipeptídicos de la presente invención en los que se vincula un scFv monovalente al extremo N- o C-terminal de una región variable de cadena ligera de las dos regiones variables de cadena ligera de la estructura del anticuerpo pueden producirse eficazmente utilizando un dominio Fc descrito anteriormente derivado de un anticuerpo biespecífico.

35 En otra realización, con el fin de vincular un dominio de unión a CD3 divalente a la estructura del anticuerpo, un dominio de unión a CD3 monovalente puede estar vinculado a un enlace peptídico a los extremos N-terminales respectivos de dos regiones variables de cadena pesada de la estructura del anticuerpo. Alternativamente, con el fin de vincular un dominio de unión a CD3 divalente a la estructura del anticuerpo, un scFv divalente (es decir, sc(Fv)₂)
40 puede estar vinculado a un enlace peptídico al extremo N-terminal de una de las dos regiones variables de cadena pesada. En este caso, los complejos polipeptídicos en los que se vincula un scFv divalente (es decir, sc(Fv)₂) al extremo N-terminal de solo una de las dos regiones variables de cadena pesada de la estructura del anticuerpo pueden producirse de manera eficiente utilizando un dominio Fc descrito anteriormente derivado de un anticuerpo biespecífico. Alternativamente, con el fin de vincular un dominio de unión a CD3 monovalente a la estructura del
45 anticuerpo, un scFv monovalente puede estar vinculado a un enlace peptídico al extremo N-terminal de una de las dos regiones variables de cadena pesada. En este caso, los complejos polipeptídicos de la presente invención en los que se vincula un scFv monovalente al extremo N-terminal de una de las dos regiones variables de cadena pesada de la estructura del anticuerpo pueden producirse de manera eficiente utilizando un dominio Fc descrito anteriormente derivado de un anticuerpo biespecífico.

Además, un complejo polipeptídico descrito anteriormente puede producirse vinculando cada dominio directamente a
50 través de un enlace peptídico o mediante un péptido que se une a un enlazador peptídico. En este caso, el enlazador que se utilizará incluye el enlazador descrito anteriormente como ejemplo y los enlazadores apropiados con una etiqueta peptídica, por ejemplo, etiqueta His, etiqueta HA, etiqueta myc o etiqueta FLAG. Además, se prefiere utilizar la propiedad de unión mutua basada en enlaces de hidrógeno, enlaces disulfuro, enlaces covalentes o interacción iónica, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, es posible emplear la afinidad entre el
55 anticuerpo CH1 y CL, o los dominios Fc descritos anteriormente derivados de un anticuerpo biespecífico pueden utilizarse para la asociación heteromérica de los dominios Fc. Además, los enlaces disulfuro entre dominios pueden utilizarse preferiblemente como se describe en los Ejemplos.

En otra estructura del complejo polipeptídico, por ejemplo, un Fv monovalente y un Fab monovalente se utilizan preferiblemente como (1) el dominio de unión a antígeno. En este caso, se utiliza la siguiente estructura. El
60 fragmento Fv de cadena pesada (VP) o el fragmento Fv de cadena ligera (VL) del Fv monovalente está vinculado por un enlace peptídico al dominio CH1 de la cadena pesada. El dominio CH1 de la cadena pesada está vinculado

5 por un enlace peptídico a uno de (2) los dos dominios Fc con actividad de unión al receptor Fc γ reducida que forman el complejo polipeptídico de la presente invención. El otro fragmento VL o VP del Fv monovalente está vinculado a través del enlace peptídico al dominio CH de la cadena ligera que está vinculado por un enlace disulfuro al dominio CH1 de la cadena pesada. Por lo tanto, VP y VL, respectivamente, vinculadas a los extremos terminales del dominio CH1 de cadena pesada y el dominio CL de cadena ligera forman un dominio de unión a anticuerpo. sc(Fv)₂, que forma tanto el (1) dominio de unión a anticuerpo como (3) el dominio de unión a CD3, puede estar vinculado mediante un enlace peptídico al extremo N-terminal del otro dominio Fc de los dos descritos anteriormente. En este caso, un complejo polipeptídico que tiene una estructura en la que se vincula el dominio CH1 de la cadena pesada por un enlace peptídico a uno de los dos dominios Fc que forman el complejo polipeptídico, y sc(Fv)₂ se vincula
10 enlace peptídico al otro dominio Fc pueden ser producidos utilizando un dominio Fc descrito anteriormente derivado de un anticuerpo biespecífico. El complejo polipeptídico descrito anteriormente puede producirse vinculando cada dominio directamente por un enlace peptídico o por un péptido que se une a un enlazador peptídico. En este caso, el enlazador que se utilizará incluye los enlazadores descritos anteriormente como ejemplo y los enlazadores apropiados con una etiqueta peptídica, por ejemplo, etiqueta His, etiqueta HA, etiqueta myc o etiqueta FLAG.

15 En otra estructura preferida del complejo polipeptídico, por ejemplo, también se utiliza un scFv divalente como (1) el dominio de unión a antígeno. En una realización de la estructura, también es posible producir un complejo polipeptídico en el que uno de los scFv divalentes está vinculado mediante un enlace peptídico a través de VP que forma (3) el dominio de unión a CD3 a uno de los dos (2) dominios Fc con actividad de unión al receptor Fc γ reducida, y el otro scFv divalente está vinculado a un enlace peptídico a través de VL formando (3) el dominio de unión a CD3 a uno de los dos (2) dominios Fc con actividad de unión al receptor Fc γ reducida. En este caso, es posible utilizar un dominio Fc descrito anteriormente derivado de un anticuerpo biespecífico. El complejo polipeptídico descrito anteriormente puede producirse vinculando cada dominio directamente por un enlace peptídico o por un péptido que se une a un enlazador peptídico. En este caso, el enlazador que se utilizará incluye los enlazadores descritos anteriormente como ejemplo y los enlazadores apropiados con una etiqueta peptídica, por ejemplo, etiqueta His, etiqueta HA, etiqueta myc o etiqueta FLAG.
25

En otra realización de la estructura en la que se utiliza un scFv divalente como (1) el dominio de unión a antígeno, es posible producir un complejo polipeptídico en el que uno de los scFv divalentes está vinculado al enlace peptídico que forma scFv (3) el dominio de unión a CD3 a uno de los dos (2) dominios Fc con actividad de unión al receptor Fc γ reducida, y el otro scFv divalente está vinculado a un enlace peptídico al otro (2) dominio Fc con receptor Fc γ reducido. En este caso, un complejo polipeptídico en el que el scFv que forma el dominio de unión a antígeno está vinculado mediante un enlace peptídico a través de scFv que forma el dominio de unión a CD3 a uno de los dos dominios Fc que forman el complejo polipeptídico, y scFv que forma el dominio de unión a antígeno está vinculado por un enlace peptídico al otro dominio Fc, puede producirse utilizando un dominio Fc descrito anteriormente derivado de un anticuerpo biespecífico. El complejo polipeptídico descrito anteriormente puede producirse
30 vinculando cada dominio directamente por un enlace peptídico o por un péptido que se une a un enlazador peptídico. En este caso, el enlazador que se utilizará incluye los enlazadores descritos anteriormente como ejemplo y los enlazadores apropiados con una etiqueta peptídica, por ejemplo, etiqueta His, etiqueta HA, etiqueta myc o etiqueta FLAG.
35

Según el complejo polipeptídico de la presente invención, tanto el dominio de unión a antígeno como el dominio de unión al complejo receptor de células T son, cada uno, una estructura de Fab monovalente. En una realización de la estructura, es posible producir un complejo polipeptídico en el que un fragmento Fv de cadena pesada de un Fab monovalente que forma el dominio de unión a antígeno está vinculado a través de un dominio CH1 a un polipéptido que forma un dominio Fc y un fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CL, mientras que un fragmento Fv de cadena pesada del Fab que forma el dominio de unión al receptor de células T está vinculado a través de un dominio CH1 al otro polipéptido que forma el dominio Fc y un fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CL.
40
45

En otra realización de la estructura, también es posible producir un complejo polipeptídico en el que un fragmento Fv de cadena pesada de un Fab monovalente que forma el dominio de unión a antígeno está vinculado a través de un dominio CH1 a un polipéptido que forma un dominio Fc y un fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CL, mientras que un fragmento Fv de cadena ligera de un Fab que forma el dominio de unión al receptor de células T está vinculado a través de un dominio CH1 al otro polipéptido que forma el dominio Fc y un fragmento Fv de cadena pesada del Fab está vinculado a un dominio CL. Alternativamente, también es posible producir un complejo polipeptídico en el que un fragmento Fv de cadena pesada de un Fab monovalente que forma el dominio de unión al receptor de células T se vincula a través de un dominio CH1 a un polipéptido que forma un dominio Fc y un fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CL, mientras que un fragmento Fv de cadena ligera de un Fab que forma el dominio de unión a antígeno está vinculado a través de un dominio CH1 al otro polipéptido que forma un dominio Fc y un fragmento Fv de cadena pesada del Fab está vinculado a un dominio CL.
50
55

En otra realización de la estructura, también es posible producir un complejo polipeptídico en el que un fragmento Fv de cadena pesada de un Fab monovalente que forma el dominio de unión a antígeno está vinculado a través de un dominio CH1 a un polipéptido que forma un dominio Fc y un fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CL, mientras que un fragmento Fv de cadena pesada del Fab que forma el dominio de unión al receptor de células T está vinculado a través de un dominio CL al otro polipéptido que forma un dominio Fc y un fragmento Fv
60

de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CH1. Alternativamente, también es posible producir un complejo polipeptídico en el que un fragmento Fv de cadena pesada de un Fab monovalente que forma el dominio de unión al receptor de células T se vincula a través de un dominio CH1 a un polipéptido que forma un dominio Fc y un fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CL, mientras que un fragmento Fv de cadena pesada que forma el dominio de unión al antígeno está vinculado a través de un dominio CL al otro polipéptido que forma un dominio Fc y un fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CH1.

Se describe otra estructura del complejo polipeptídico en el que tanto el dominio de unión a antígeno como el dominio de unión al complejo receptor de células T son cada uno una estructura de Fab monovalente, los polipéptidos preferidos incluyen aquellos que tienen:

(1) un dominio de unión a antígeno en el que un fragmento Fv de cadena pesada de una estructura Fab monovalente que se une a un antígeno se vincula a través de un dominio CH1 a uno de los polipéptidos descritos anteriormente que forman un dominio Fc y un fragmento Fv de cadena ligera de la estructura Fab está vinculado a un dominio CL; y

(2) un dominio de unión al complejo receptor de células T en el que un fragmento Fv de cadena pesada de una estructura Fab monovalente que se une a un complejo receptor de células T se vincula a través de un dominio CH1 al otro polipéptido que forma un dominio Fc y un fragmento Fv de cadena ligera de la estructura Fab está vinculado a un dominio CL;

y en el que las cargas eléctricas de los dominios CH1 y CL se controlan de manera que el fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al antígeno se asocie con el fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión a antígeno, o el fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al receptor de células T está asociado con el fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión al receptor de células T. En esta realización, la estructura (estructura con asociación controlada) del complejo polipeptídico no se limita a una estructura particular, siempre que las cargas eléctricas de los dominios CH1 y CL se controlen de manera que el fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión a antígeno está asociado con el fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión a antígeno, o el fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al receptor de células T está asociado con el fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión al receptor de células T.

En una realización de la estructura con asociación controlada, es posible producir un complejo polipeptídico en el que los residuos de aminoácidos del dominio CH1 vinculados al fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al complejo receptor de células T tengan las mismas cargas eléctricas que los residuos aminoácidos del dominio CL vinculados al fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión a antígeno.

En una realización de la estructura con asociación controlada, es posible producir un complejo polipeptídico en el que los residuos de aminoácidos del dominio CH1 vinculados al fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al antígeno tengan las mismas cargas eléctricas que los residuos de aminoácidos del dominio CL vinculados al fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión al complejo receptor de células T.

En una realización de la estructura con asociación controlada, es posible producir un complejo polipeptídico en el que los residuos de aminoácidos del dominio CH1 vinculados al fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al complejo del receptor de células T tengan las mismas cargas eléctricas que el amino los residuos ácidos del dominio CL vinculados al fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión al antígeno, y los residuos de aminoácidos del dominio CH1 vinculados al fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al antígeno tengan las mismas cargas eléctricas que los residuos de aminoácidos del dominio CL vinculados al fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión al complejo receptor de células T.

En otra realización de la estructura con asociación controlada, es posible producir un complejo polipeptídico en el que los residuos de aminoácidos del dominio CH1 vinculados al fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al complejo receptor de células T tengan las mismas cargas eléctricas que los residuos aminoácidos del dominio CL vinculados al fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión a antígeno, y los residuos de aminoácidos del dominio CH1 vinculados al fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al complejo receptor de células T tengan cargas eléctricas opuestas a las de los residuos de aminoácidos del dominio CL vinculados al fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión al receptor de células T.

En otra realización de la estructura con asociación controlada, es posible producir un complejo polipeptídico en el que los residuos de aminoácidos del dominio CH1 vinculados al fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al complejo receptor de células T tengan las mismas cargas eléctricas que los residuos de aminoácidos del dominio CL vinculados al fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión a antígeno; los residuos de aminoácidos del dominio CH1 vinculados al fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al antígeno tengan las mismas cargas eléctricas que los residuos de aminoácidos del dominio CL vinculados al fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión al complejo receptor de células T; y los residuos de aminoácidos del dominio CH1 vinculados al fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al complejo receptor de células T tengan cargas eléctricas opuestas a las de los residuos de aminoácidos del dominio CL vinculados al fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión al receptor de células T.

En otra realización de la estructura con asociación controlada, es posible producir un complejo polipeptídico en el

que los residuos de aminoácidos del dominio CH1 vinculados al fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al antígeno tengan las mismas cargas eléctricas que los residuos de aminoácidos del dominio CL vinculados al fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión al complejo receptor de células T, y los residuos de aminoácidos del dominio CH1 vinculados al fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al antígeno
 5 tengan cargas eléctricas opuestas a las de los residuos de aminoácidos del dominio CL vinculados al fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión a antígeno.

En una realización alternativa de la estructura con asociación controlada, es posible producir un complejo polipeptídico en el que los residuos de aminoácidos del dominio CH1 vinculados al fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al complejo receptor de células T tengan las mismas cargas eléctricas que los residuos de aminoácidos del dominio CL vinculados al fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión a antígeno; los residuos de aminoácidos del dominio CH1 vinculados al fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al antígeno tengan las mismas cargas eléctricas que los residuos de aminoácidos del dominio CL vinculados al fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión al complejo receptor de células T; y los residuos de aminoácidos del dominio CH1 vinculados al fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al antígeno
 10 tengan cargas eléctricas opuestas a las de los residuos de aminoácidos del dominio CL vinculados al fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión al antígeno.
 15

En otra realización de la estructura con asociación controlada, es posible producir un complejo polipeptídico en el que los residuos de aminoácidos del dominio CH1 vinculados al fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al complejo receptor de células T tengan las mismas cargas eléctricas que los residuos de aminoácidos del dominio CL vinculados al fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión a antígeno; los residuos de aminoácidos del dominio CH1 vinculados al fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al antígeno tengan las mismas cargas eléctricas que los residuos de aminoácidos del dominio CL vinculados al fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión al complejo receptor de células T; los residuos de aminoácidos del dominio CH1 vinculados al fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al complejo receptor de células T tengan cargas eléctricas opuestas a las de los residuos de aminoácidos del dominio CL vinculados al fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión al receptor de células T; y los residuos de aminoácidos del dominio CH1 vinculados al fragmento Fv de cadena pesada del dominio de unión al antígeno tengan cargas eléctricas opuestas a las de los residuos de aminoácidos del dominio CL vinculados al fragmento Fv de cadena ligera del dominio de unión al antígeno.
 20
 25

30 Control de cargas eléctricas de dominios CH1 y CL

Para obtener un complejo polipeptídico biespecífico que reconozca un epítipo del dominio de unión al receptor de células T por las cadenas pesada y ligera del dominio de unión al receptor de células T, y un epítipo de un antígeno por las cadenas pesada y ligera del dominio de unión al antígeno, teóricamente se producen diez tipos de moléculas de complejos polipeptídicos si cada una de las cuatro cadenas se expresa al producir el complejo polipeptídico.

35 Sin embargo, la molécula de complejo polipeptídico deseada puede obtenerse preferentemente, por ejemplo, controlando los dominios para inhibir la asociación entre la cadena pesada del dominio de unión al receptor de células T y la cadena ligera del dominio de unión a antígeno, y/o la asociación entre la cadena pesada del dominio de unión a antígeno y la cadena ligera del dominio de unión al receptor de células T.

Los ejemplos incluyen alteraciones de los residuos de aminoácidos que forman una interfaz entre la cadena pesada CH1 del dominio de unión al receptor de células T y la cadena ligera CL del dominio de unión al antígeno a residuos de aminoácidos cargados positivamente, y las alteraciones de los residuos de aminoácidos que forman una interfaz entre la cadena pesada CH1 del dominio de unión a antígeno y la cadena ligera CL del dominio de unión al receptor de células T a residuos de aminoácidos cargados negativamente. Como resultado de tales alteraciones, se inhibe la asociación no deseada entre la cadena pesada CH1 del dominio de unión al receptor de células T y la cadena ligera CL del dominio de unión al antígeno ya que las cargas eléctricas de los residuos de aminoácidos que forman la interfaz son ambas positivas y la asociación no deseada entre la cadena pesada CH1 del dominio de unión a antígeno y la cadena ligera CL del dominio de unión al receptor de células T también se inhibe ya que las cargas eléctricas de los residuos de aminoácidos que forman la interfaz son ambas negativas. Un complejo polipeptídico deseado de la presente invención puede producirse eficazmente como resultado de la asociación deseada entre la cadena pesada CH1 del dominio de unión al receptor de células T y la cadena ligera CL del dominio de unión al receptor de células T, así como la asociación deseada entre la cadena pesada CH1 del dominio de unión a antígeno y la cadena ligera CL del dominio de unión a antígeno. Además, la asociación deseada entre las cadenas ligeras y pesadas de los dominios de unión al receptor de células T se promueve preferiblemente ya que los residuos de aminoácidos que forman la interfaz tienen cargas eléctricas opuestas entre sí. La asociación deseada entre las cadenas pesada y ligera de los dominios de unión a antígeno también se promueve preferiblemente ya que los residuos de aminoácidos que forman la interfaz tienen cargas eléctricas opuestas entre sí. Esto permite la producción eficiente de un complejo polipeptídico de la presente invención con la asociación deseada.
 40
 45
 50
 55

Además, el control de la asociación en la presente invención también se puede utilizar para inhibir la asociación entre los CH1s (las cadenas pesadas del dominio de unión al receptor de células T y el dominio de unión al antígeno) o entre las CL (las cadenas ligeras del dominio de unión al receptor de células T y dominio de unión a
 60

antígeno).

Aquellos expertos en la técnica pueden encontrar apropiadamente en un complejo polipeptídico deseado, cuya asociación se controla según la presente invención, los tipos de residuos de aminoácidos que se encuentran en estrecha proximidad en la interfaz CH1/CL tras la asociación.

5 Además, al utilizar bases de datos públicas o similares, los expertos en la técnica pueden encontrar apropiadamente las secuencias de anticuerpo CH1 y CL utilizables en un organismo, tal como ser humano, mono, ratón o conejo. Más específicamente, la información de la secuencia de aminoácidos de CH1 y CL se puede obtener mediante los métodos descritos a continuación en los Ejemplos.

10 Específicamente, como se muestra en los ejemplos que se describen a continuación, ejemplos específicos de combinaciones de residuos de aminoácidos que se ubican muy cerca (orientados entre sí o en contacto) en la interfaz CH1/CL tras la asociación entre CH1 y CL que están respectivamente vinculados a VP y a VL que forman el dominio de unión al receptor de células T o el dominio de unión a antígeno incluyen:

- 15 - lisina (K) en la posición 147 (numeración de la UE) en CH1 (por ejemplo, posición 147 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) y treonina (T) en la posición 180 (numeración de la UE) orientadas (en contacto) con CL;
- lisina (K) en la posición 147 (numeración de la UE) en CH1 y serina (S) en la posición 131 (numeración de la UE) orientadas (en contacto) con CL;
- lisina (K) en la posición 147 (numeración de la UE) en CH1 y treonina (T) en la posición 164 (numeración de la UE) orientadas (en contacto) con CL;
- 20 - lisina (K) en la posición 147 (numeración de la UE) en CH1 y asparagina (N) en la posición 138 (numeración de la UE) en CL, que se orientan (en contacto) entre sí;
- lisina (K) en la posición 147 (numeración de la UE) en CH1 y ácido glutámico (E) en la posición 123 (numeración de la UE) orientados (en contacto) con CL;
- 25 - glutamina (Q) en la posición 175 (numeración de la UE) en CH1 y glutamina (Q) en la posición 160 (numeración de la UE) orientado (en contacto) con CL; o
- lisina (K) en la posición 213 (numeración de la UE) en CH1 y ácido glutámico (E) en la posición 123 (numeración de la UE) orientado (en contacto) con CL.

Estas posiciones están numeradas según el documento de Kabat *et al.* (Kabat EA *et al.*, 1991. *Sequence of Proteins of Immunological Interest*. NIH).

30 En esta memoria, los números indicados por la numeración de la UE se asignan según la numeración de la UE (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, publicación NIH n.º 91-3242). En la presente invención, "residuo de aminoácido en la posición X (numeración de la UE)" y "aminoácido en la posición X (numeración de la UE)" (donde X es un número arbitrario) son intercambiables con "residuo de aminoácido correspondiente a la posición X (numeración de la UE)", "aminoácido correspondiente a la posición X (numeración de la UE)".

35 Como se describe en los Ejemplos a continuación, un complejo polipeptídico deseado puede obtenerse preferentemente alterando los residuos de aminoácidos y realizando los métodos de la presente invención.

40 Se sabe que los residuos de aminoácidos descritos anteriormente están altamente conservados en seres humanos y ratones (*J. Mol. Recognit.* (2003) 16, 113-120). Por consiguiente, la asociación entre CH1 y CL en la región constante de un complejo polipeptídico de la presente invención distinta de los complejos polipeptídicos descritos en los Ejemplos también puede controlarse alterando los residuos de aminoácidos correspondientes a los residuos de aminoácidos descritos anteriormente.

Específicamente, se describen complejos polipeptídicos con asociación controlada entre la cadena pesada y la cadena ligera, en la que uno, dos o más pares seleccionados del grupo que consiste en los pares de residuos de aminoácidos descritos en (a) a (f) a continuación tienen las mismas cargas eléctricas:

- 45 (a) el residuo de aminoácido en la posición 147 (numeración de la UE) en CH1 y el residuo de aminoácido en la posición 180 (numeración de la UE) en CL;
- (b) el residuo de aminoácido en la posición 147 (numeración de la UE) en CH1 y el residuo de aminoácido en la posición 131 (numeración de la UE) en CL;
- 50 (c) el residuo de aminoácido en la posición 147 (numeración de la UE) en CH1 y el residuo de aminoácido en la posición 164 (numeración de la UE) en CL;
- (d) el residuo de aminoácido en la posición 147 (numeración de la UE) en CH1 y el residuo de aminoácido en la posición 138 (numeración de la UE) en CL;
- (e) el residuo de aminoácido en la posición 147 (numeración de la UE) en CH1 y el residuo de aminoácido en la posición 123 (numeración de la UE) en CL; y
- 55 (f) el residuo de aminoácido en la posición 175 (numeración de la UE) en CH1 y el residuo de aminoácido en la posición 160 (numeración de la UE) en CL.

Además, en otra realización, se describen anticuerpos en los que los residuos de aminoácidos en el par de residuos

de aminoácidos descritos en (g) a continuación tienen las mismas cargas eléctricas:

(g) el residuo de aminoácido en la posición 213 (numeración de la UE) en CH1 y el residuo de aminoácido en la posición 123 (numeración de la UE) en CL.

5 Los residuos de aminoácidos en cada uno de los pares descritos anteriormente se ubican muy próximos entre sí tras la asociación, como se describe en los EJEMPLOS a continuación. Mediante modelos de homología u otros métodos que utilizan software disponible comercialmente, los expertos en la técnica pueden encontrar apropiadamente las posiciones de aminoácidos de CH1 o CL deseadas correspondientes a los residuos de aminoácidos descritos en (a) a (g) anteriormente, y pueden alterar apropiadamente los residuos de aminoácidos en esas posiciones.

10 Dicho "residuo de aminoácido eléctricamente cargado" en un anticuerpo descrito anteriormente se selecciona preferiblemente, por ejemplo, de los residuos de aminoácidos que pertenecen al grupo (X) o (Y) descrito a continuación:

(X) ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D); y
(Y) lisina (K), arginina (R) e histidina (H).

15 En los complejos polipeptídicos descritos anteriormente, "tiene la misma carga eléctrica" significa que, por ejemplo, los dos o más residuos de aminoácidos pertenecen a uno de los grupos (X) e (Y) descritos anteriormente. Por otra parte, "tiene una carga eléctrica opuesta" significa que, por ejemplo, al menos uno de dos o más residuos de aminoácidos tiene un residuo de aminoácido que pertenece a uno de los grupos (X) e (Y) descritos anteriormente, mientras que los otros residuos de aminoácidos tienen un residuo de aminoácidos que pertenece al otro grupo.

20 Los residuos de aminoácidos que "van a alterarse" no están limitados a los residuos de aminoácidos descritos anteriormente de la región constante. Mediante un modelo de homología u otros métodos que utilizan software disponible comercialmente, los expertos en la técnica pueden identificar apropiadamente los residuos de aminoácidos que forman una interfaz en un polipéptido mutante o multímero heteromérico y alterar adecuadamente los residuos de aminoácidos en esas posiciones para controlar la asociación.

25 En las técnicas para inhibir la asociación no deseada entre la cadena pesada y la cadena ligera mediante la introducción de la repulsión de carga en la interfaz entre las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, los residuos de aminoácidos en contacto entre sí en la interfaz entre la región variable de la cadena pesada (VP) y la región variable de la cadena ligera (VL) incluyen, por ejemplo, glutamina (Q) en la posición 39 (por ejemplo, la posición 39 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 en el documento WO 2006/106905) en la región variable de la cadena pesada FR2 y glutamina (Q) en la posición 38 (por ejemplo, la posición 44 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 en el documento WO 2006/106905) orientadas (en contacto) con la región variable de la cadena ligera FR2. Tales residuos de aminoácidos preferidos también incluyen, por ejemplo, leucina (L) en la posición 45 (por ejemplo, la posición 45 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 en el documento WO 2006/106905) en la región variable de la cadena pesada FR2 y prolina (P) en la posición 44 (por ejemplo, la posición 44 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 en el documento WO 2006/106905) orientadas en la región variable de la cadena ligera FR2. Estas posiciones están numeradas según el documento de Kabat *et al.* (Kabat *et al.* 1991. *Sequence of Proteins of Immunological Interest*. NIH).

40 Se sabe que los residuos de aminoácidos descritos anteriormente están altamente conservados en seres humanos y ratones (*J. Mol. Recognit.* (2003) 16, 113-120). Por consiguiente, la asociación entre VP y VL en regiones variables de anticuerpos distintas de los complejos polipeptídicos descritos en los Ejemplos también puede controlarse alterando los residuos de aminoácidos correspondientes a los residuos de aminoácidos descritos anteriormente.

Más específicamente, dichos anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera incluyen aquellos en los que los residuos de aminoácidos de (1) y (2), o (3) y (4) descritos a continuación tienen las mismas cargas eléctricas:

45 (1) el residuo de aminoácido correspondiente a la posición 39 (numeración de la UE) en la región variable de la cadena pesada;
(2) el residuo de aminoácido correspondiente a la posición 38 (numeración de la UE) en la región variable de la cadena ligera;
50 (3) el residuo de aminoácido correspondiente a la posición 45 (numeración de la UE) en la región variable de la cadena pesada;
(4) el residuo de aminoácido correspondiente a la posición 44 (numeración de la UE) en la región variable de la cadena ligera.

55 Los residuos de aminoácidos de (1) y (2), o (3) y (4) descritos anteriormente se encuentran muy próximos entre sí en el momento de la asociación. Mediante modelos de homología u otros métodos que utilizan software disponible comercialmente, los expertos en la técnica pueden identificar adecuadamente las posiciones de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada o cadena ligera que correspondan a los residuos de aminoácidos descritos en (1) a (4) arriba, y pueden alterar apropiadamente los residuos de aminoácidos en esas posiciones.

En un anticuerpo descrito anteriormente, el "residuo de aminoácido eléctricamente cargado" se selecciona preferiblemente, por ejemplo, de los residuos de aminoácidos que pertenecen al grupo (X) o (Y) a continuación:

(X) ácido glutámico (E) y aspártico ácido (D); y
(Y) lisina (K), arginina (R) e histidina (H).

5 En seres humanos y ratones, en general, los residuos de aminoácidos de (1) a (4) descritos anteriormente son:

(1) glutamina (Q);
(2) glutamina (Q);
(3) leucina (L); y
(4) prolina (P), respectivamente.

10 En una realización preferida, los residuos de aminoácidos descritos anteriormente se alteran (por ejemplo, la sustitución con un aminoácido cargado). Los tipos de residuos de aminoácidos (1) a (4) descritos anteriormente no se limitan a los descritos anteriormente. Estos aminoácidos pueden ser cualquier otro aminoácido correspondiente a los descritos anteriormente. Por ejemplo, en el caso de los humanos, un aminoácido que corresponde al aminoácido en la posición 38 (numeración de la UE) en la región variable de la cadena ligera puede ser histidina (H). Al referirse a documentos publicados (por ejemplo, *J. Mol. Recognit.* (2003) 16, 113-120) o similares, los expertos en la técnica pueden encontrar el tipo de residuo de aminoácido correspondiente a una posición arbitraria en la cadena ligera, y así pueden alterar adecuadamente el residuo de aminoácido (por ejemplo, sustitución con un aminoácido cargado).

15 En las técnicas para inhibir la asociación no deseada entre la cadena pesada y la cadena ligera sustituyendo aminoácidos polares cargados eléctricamente con los residuos de aminoácidos que forman el núcleo hidrófobo en la interfaz entre las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, los residuos de aminoácidos preferidos capaces de formar el núcleo hidrófobo en la interfaz entre la región variable de la cadena pesada (VP) y la región variable de la cadena ligera (VL) incluyen, por ejemplo, leucina (L) en la posición 45 en la región variable de la cadena pesada y prolina (P) en la posición 44 orientadas en la región variable de la cadena ligera.

20 En general, un "núcleo hidrófobo" se refiere a una porción donde las cadenas laterales de aminoácidos hidrófobos se ensamblan dentro del polipéptido asociado. Los aminoácidos hidrófobos incluyen, por ejemplo, alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano y valina. Mientras tanto, los residuos de aminoácidos distintos de los aminoácidos hidrófobos (por ejemplo, tirosina) también pueden participar en la formación del núcleo hidrófobo. Junto con la superficie hidrófila de la exposición externa de las cadenas laterales de aminoácidos hidrófilos, el núcleo hidrófobo sirve como fuerza motriz para promover la asociación de polipéptidos solubles en agua. Cuando los aminoácidos hidrófobos de dos dominios diferentes están presentes en la superficie molecular y se exponen a moléculas de agua, la entropía aumenta, lo que resulta en un aumento de la energía libre. Por lo tanto, los dos dominios se asocian entre sí para disminuir la energía libre para la estabilización. Los aminoácidos hidrófobos en la interfaz están ocultos dentro de la molécula para formar un núcleo hidrófobo.

25 Se considera que cuando los aminoácidos hidrófobos que forman un núcleo hidrófobo en la asociación polipeptídica se alteran a aminoácidos polares con carga eléctrica, se inhibe la formación de núcleo hidrófobo. Esto da lugar a la inhibición de la asociación de polipéptidos.

30 Otras tecnologías conocidas también son aplicables a los complejos polipeptídicos de la presente invención. Por ejemplo, para promover la asociación de la primera VP (VH1) y la primera VL (VL1), y/o la segunda VP (VH2) y la segunda VL (VL2), además de las "alteraciones" de la presente invención, los aminoácidos en una de las regiones variables de la cadena P están sustituidos con aquellos que tienen una cadena lateral más grande (botón; protuberancia) y los aminoácidos en la otra región variable de la cadena P están sustituidos con aquellos que tienen una cadena lateral más pequeña (ojal; vacío) de manera que el botón se coloca en el ojal. Esto promueve la asociación de VH1 y VL1, y/o VH2 y VL2, dando como resultado una inhibición adicional de la asociación entre VH1 y VL2 y/o entre los polipéptidos VH2 y VL1 (documento WO 1996/027011; Ridgway JB *et al.*, *Protein Engineering* (1996) 9, 617-621; Merchant AM *et al.*, *Nature Biotechnology* (1998) 16, 677-681).

35 En la producción de un complejo polipeptídico descrito anteriormente, cada dominio puede estar vinculado directamente por un enlace peptídico o por un péptido que se une a un enlazador peptídico. En este caso, el enlazador que se utilizará incluye el enlazador descrito anteriormente como ejemplo y los enlazadores apropiados con una etiqueta peptídica, por ejemplo, etiqueta His, etiqueta HA, etiqueta myc o etiqueta FLAG. Además, es preferible utilizar la propiedad de unión mutua basándose en enlaces de hidrógeno, enlaces disulfuro, enlaces covalentes o interacción iónica, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, es posible emplear la afinidad entre CH1 y CL del anticuerpo, o los dominios Fc descritos anteriormente derivados de un anticuerpo biespecífico pueden utilizarse para la asociación heteromérica de los dominios Fc. Además, los enlaces disulfuro entre dominios pueden utilizarse preferiblemente como se describe en los EJEMPLOS.

40 Los complejos polipeptídicos de la presente invención incluyen, por ejemplo, las realizaciones mostradas en las Figs. 17, 19 y 24.

Los complejos polipeptídicos de la presente invención pueden producirse por los mismos métodos que los métodos

descritos anteriormente para producir anticuerpos recombinantes.

Además, la presente descripción se refiere a polinucleótidos que codifican el complejo polipeptídico de la presente invención. Un complejo polipeptídico de la presente invención puede insertarse en cualquier vector de expresión. Un huésped apropiado se transforma con el vector de expresión para obtener células que expresan el complejo polipeptídico. El complejo polipeptídico codificado por el polinucleótido se puede obtener cultivando células que expresan el complejo polipeptídico y recogiendo el producto de expresión del sobrenadante del cultivo. Específicamente, la presente descripción se refiere a vectores que llevan un polinucleótido que codifica el complejo polipeptídico de la presente invención, células que contienen los vectores y métodos para producir el complejo polipeptídico de la presente invención, en el que las células se cultivan y el complejo polipeptídico se recoge del sobrenadante del cultivo. Los descritos anteriormente pueden obtenerse mediante las mismas tecnologías descritas anteriormente para los anticuerpos recombinantes.

Composición farmacéutica

La presente invención también se refiere a agentes terapéuticos para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer, que comprende como principio activo el complejo polipeptídico de la presente invención, se administran preferiblemente a sujetos con cáncer o con una probabilidad de recurrencia del cáncer.

En esta memoria, "que comprende como principio activo" significa que comprende el complejo polipeptídico como el principio activo principal; sin embargo, la relación de contenido del complejo polipeptídico no está limitada.

Un agente terapéutico para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer según la presente invención se puede formular con diferentes tipos de complejos polipeptídicos, si es necesario. Por ejemplo, la acción citotóxica contra las células que expresan un antígeno puede potenciarse mediante un cóctel de múltiples complejos polipeptídicos de la presente invención que se unen al mismo antígeno. Alternativamente, el efecto terapéutico puede aumentarse formulando un complejo polipeptídico de la presente invención que comprende un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno canceroso en combinación con otros complejos polipeptídicos que comprenden un dominio de unión a antígeno contra un antígeno diferente.

Si es necesario, los complejos polipeptídicos de la presente invención pueden encapsularse en microcápsulas (microcápsulas fabricadas a partir de hidroximetilcelulosa, gelatina, poli[metilmetacrilato] y similares), y convertirse en componentes de sistemas de entrega de fármacos coloidales (liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) (por ejemplo, véase "*Remington's Pharmaceutical Science* 16^a edición", Oslo Ed. (1980)). Además, se conocen métodos para preparar agentes como agentes de liberación sostenida, y estos pueden aplicarse a los complejos polipeptídicos de la presente invención (*J. Biomed. Mater. Res.* (1981) 15, 267-277; *Chemtech.* (1982) 12, 98-105; patente de Estados Unidos n.º 3773719; solicitud de patente europea (EP) n.º EP58481 y EP133988; *Biopolymers* (1983) 22, 547-556).

Los agentes anti-cancerígenos para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer según la presente invención pueden administrarse por vía oral o parenteral a los pacientes. Se prefiere la administración parental. Específicamente, dichos métodos de administración incluyen inyección, administración nasal, administración transpulmonar y administración percutánea. Las inyecciones incluyen, por ejemplo, inyecciones intravenosas, inyecciones intramusculares, inyecciones intraperitoneales e inyecciones subcutáneas. Por ejemplo, los agentes para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer según la presente invención se pueden administrar local o sistémicamente mediante inyección. Además, los métodos de administración apropiados se pueden seleccionar según la edad y los síntomas del paciente. La dosis administrada se puede seleccionar, por ejemplo, del intervalo de 0,0001 mg a 1,000 mg por kg de peso corporal para cada administración. Alternativamente, la dosis puede seleccionarse, por ejemplo, del intervalo de 0.001 mg/cuerpo a 100.000 mg/cuerpo por paciente. Sin embargo, la dosis de un agente terapéutico para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer según la presente invención no se limita a estas dosis.

El agente terapéutico para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer según la presente invención puede formularse según métodos convencionales (por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Science*, última edición, Mark Publishing Company, Easton, EE.UU.), y también puede contener vehículos y aditivos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tensioactivos, excipientes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, conservantes, estabilizantes, tampones, agentes de suspensión, agentes isotónicos, aglutinantes, desintegrantes, lubricantes, agentes promotores de la fluidez y correctores, y otros vehículos de uso común pueden ser adecuadamente utilizados. Los ejemplos específicos de los vehículos incluyen ácido silícico anhídrido ligero, lactosa, celulosa cristalina, manitol, almidón, carmelosa cálcica, carmelosa sódica, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilacetato dietilaminoacetato, polivinilpirrolidona, gelatina, triglicéridos de cadena media, aceite de ricino 60 endurecido con polioxietileno, sacarosa, carboximetilcelulosa, almidón de maíz, sal inorgánica y similares.

La presente descripción también proporciona métodos para dañar células que expresan un antígeno canceroso o para suprimir el crecimiento celular poniendo en contacto las células que expresan el antígeno canceroso con un complejo polipeptídico de la presente invención que se une al antígeno canceroso.

Los anticuerpos monoclonales que se unen al antígeno canceroso se describen anteriormente como un complejo polipeptídico de unión al antígeno canceroso de la presente invención, que se incluye en los agentes terapéuticos para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer. Las células a las que se une un complejo polipeptídico de unión a antígeno canceroso de la presente invención no están particularmente limitadas, siempre que expresen el antígeno canceroso. Específicamente, las células que expresan antígeno canceroso preferidas incluyen células de cáncer de ovario, células de cáncer de próstata, células de cáncer de mama, células de cáncer de útero, células de cáncer de hígado, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de páncreas, células de cáncer de estómago, cáncer de vejiga urinaria células, y células de cáncer de colon. Cuando el antígeno canceroso es GPC3, las células no están limitadas siempre que sean células cancerosas que expresen GPC3. Sin embargo, las células cancerosas preferidas incluyen células de hepatocarcinoma, células de cáncer de pulmón y células de cáncer de ovario.

El "contacto" puede llevarse a cabo, por ejemplo, añadiendo un complejo polipeptídico de unión a antígeno canceroso de la presente invención a medios de cultivo de células que expresan el antígeno canceroso cultivado *in vitro*. En este caso, un complejo polipeptídico a añadir puede utilizarse en una forma apropiada, tal como una solución o un sólido preparado por liofilización o similares. Cuando el complejo polipeptídico de la presente invención se añade como una solución acuosa, la solución puede ser una solución acuosa pura que contenga el complejo polipeptídico solo o una solución que contenga, por ejemplo, un agente tensioactivo, excipiente, agente colorante, agente saborizante, conservante, estabilizador, agente tamponante, agente de suspensión, agente isotonzante, aglutinante, desintegrador, lubricante, acelerador de fluidez y corrector descrito anteriormente. La concentración añadida no está particularmente limitada; sin embargo, la concentración final en un medio de cultivo está preferiblemente en un intervalo de 1 pg/ml a 1 g/ml, más preferiblemente 1 ng/ml a 1 mg/ml, y aún más preferiblemente 1 µg/ml a 1 mg/ml.

El "contacto" también puede llevarse a cabo mediante administración a animales no humanos trasplantados con células que expresan antígeno canceroso *in vivo* o a animales que tienen células cancerosas que expresan el antígeno canceroso de forma endógena. El método de administración puede ser oral o parenteral. La administración parenteral es particularmente preferida. Específicamente, el método de administración parenteral incluye inyección, administración nasal, administración pulmonar y administración percutánea. Las inyecciones incluyen, por ejemplo, inyecciones intravenosas, inyecciones intramusculares, inyecciones intraperitoneales e inyecciones subcutáneas. Por ejemplo, los agentes terapéuticos para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer inducir según la presente invención se pueden administrar local o sistémicamente mediante inyección. Además, se puede seleccionar un método de administración apropiado según la edad y los síntomas de un sujeto animal. Cuando el complejo polipeptídico se administra como una solución acuosa, la solución puede ser una solución acuosa pura que contenga el complejo polipeptídico solo o una solución que contenga, por ejemplo, un agente tensioactivo, excipiente, agente colorante, agente saborizante, conservante, estabilizador, agente tamponante, agente de suspensión, agente isotonzante, aglutinante, desintegrador, lubricante, acelerador de fluidez y corrector descrito anteriormente. La dosis administrada se puede seleccionar, por ejemplo, del intervalo de 0,0001 a 1,000 mg por kg de peso corporal para cada administración. Alternativamente, la dosis se puede seleccionar, por ejemplo, del intervalo de 0,001 a 100,000 mg/cuerpo para cada paciente. Sin embargo, la dosis de un complejo polipeptídico de la presente invención no se limita a estos ejemplos.

Los métodos descritos a continuación se utilizan preferiblemente como un método para evaluar o determinar la citotoxicidad celular causada por el contacto de un complejo polipeptídico de la presente invención con células que expresan antígeno a las que se une el dominio de unión a antígeno que forma el complejo polipeptídico de la presente invención. Los métodos para evaluar o determinar la actividad citotóxica *in vitro* incluyen métodos para determinar la actividad de células T citotóxicas o similares. Si un complejo polipeptídico de la presente invención tiene la actividad de inducir la citotoxicidad celular mediada por células T puede determinarse mediante métodos conocidos (véase, por ejemplo, *Current protocols in Immunology*, Capítulo 7. *Immunologic studies in humans*, Editor, John E. Coligan *et al.*, John Wiley & Sons, Inc., (1993)). En el ensayo de citotoxicidad, un complejo polipeptídico cuyo dominio de unión a antígeno se une a un antígeno diferente al reconocido por el dominio de unión a antígeno del complejo polipeptídico de la presente invención y que no se expresa en las células se utiliza como un complejo polipeptídico de control. El complejo polipeptídico de control se ensaya de la misma manera. Luego, la actividad se evalúa sometiendo a ensayo si un complejo polipeptídico de la presente invención exhibe una actividad citotóxica más potente que la de un complejo polipeptídico de control.

Mientras tanto, la actividad citotóxica *in vivo* se evalúa o determina, por ejemplo, mediante el siguiente procedimiento. Las células que expresan el antígeno al que se une el dominio de unión a antígeno que forma un complejo polipeptídico de la presente invención se trasplantan de forma intracutánea o subcutánea a un sujeto animal no humano. Luego, desde el día del trasplante o posteriormente, se administra un complejo polipeptídico de ensayo en la vena o cavidad peritoneal todos los días o a intervalos de varios días. El tamaño del tumor se mide con el tiempo. La diferencia en el cambio del tamaño del tumor se puede definir como la actividad citotóxica. Como en un ensayo *in vitro*, se administra un complejo polipeptídico de control. Se puede juzgar que el complejo polipeptídico de la presente invención tiene actividad citotóxica cuando el tamaño del tumor es menor en el grupo administrado con el complejo polipeptídico de la presente invención que en el grupo administrado con el complejo polipeptídico de control.

Un método de MTT y la medición de la captación de timidina marcada con isótopos en las células se utilizan

preferiblemente para evaluar o determinar el efecto del contacto con un complejo polipeptídico de la presente invención para suprimir el crecimiento de células que expresan un antígeno al cual se une el dominio de unión a antígeno que forma el complejo polipeptídico. Mientras tanto, los mismos métodos descritos anteriormente para evaluar o determinar la actividad citotóxica *in vivo* pueden utilizarse preferiblemente para evaluar o determinar la actividad de supresión del crecimiento celular *in vivo*.

La presente invención también describe kits que contienen un complejo polipeptídico de la presente invención. Los kits pueden envasarse con un vehículo o medio farmacéuticamente aceptable adicional, o un manual de instrucciones que describa cómo utilizar los kits, etc.

Ejemplos

10 A continuación, la presente invención se describe específicamente con referencia a los Ejemplos, pero no debe interpretarse como limitada a los mismos.

[Ejemplo 1] Construcción y evaluación de ERY2 GPC3

(1) Esbozo

15 Existe un método bien conocido para prolongar la semivida en sangre de una proteína administrada *in vivo*, que se basa en el reciclado mediado por FcRn utilizando una proteína de interés conjugada a un dominio Fc de anticuerpo. Sin embargo, la conjugación de un tipo natural de Fc a BiTE podría conducir a la inducción de varias citoquinas, ya que una única molécula se uniría a una célula T a través del scFv anti-CD3 de su fracción BiTE y simultáneamente al FcγR (receptor Fcγ) en la membrana celular de, por ejemplo, una célula NK o macrófago a través de su dominio Fc, y la reticulación resultante activaría estas células de manera independiente del antígeno canceroso. Por consiguiente, se preparó una molécula denominada ERY2, en la que un BiTE está vinculado mediante un enlazador polipeptídico a un dominio Fc que tiene una actividad de unión al receptor Fcγ reducida (Fc silencioso), y la actividad de ERY2 se evaluó comparándola con la de BiTE. El scFv de un anticuerpo épsilon anti-CD3 se vinculó mediante un enlazador peptídico corto al scFv de un anticuerpo contra Glipicana 3 (GPC3), que es una proteína anclada a GPI conocida por expresarse a un nivel alto en células de cáncer de hígado, para producir BiTE contra GPC3 (BiTE GPC3) (Fig. 17A). Luego se vinculó a un Fc silencioso para producir un ERY2 contra GPC3 (ERY2 GPC3) (Fig. 20 25 17C). Además, se construyó un anticuerpo de tipo IgG anti-GPC3 normal para comparación. El anticuerpo de tipo IgG anti-GPC3 se preparó como un anticuerpo con contenido reducido de fucosa en su fracción de cadena de azúcar, es decir, un anticuerpo con un bajo contenido de fucosa, que es conocido por tener una actividad CCDA potenciada.

30 (2) Construcción de BiTE GPC3

Mediante la amplificación por PCR utilizando un vector de expresión para un anticuerpo anti-GPC3 como plantilla, se obtuvieron ADNcs, codificando cada uno una región variable de la cadena P (VP anti-GPC3) o una región variable de la cadena L (VL anti-GPC3). La PCR se realizó utilizando cebadores que contienen secuencias adicionales apropiadas y los ADNc anteriores como plantillas para construir un fragmento de ADNc que codifica un scFv anti-GPC3 que tiene una secuencia de aminoácidos en la que el VP anti-GPC3 y VL anti-GPC3 se vincularon mediante un enlazador con tres repeticiones de Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 7).

40 Además, se prepararon una serie de oligonucleótidos, cada uno de los cuales tenía una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia parcial de la región variable de la cadena P (VP M12) o la región variable de la cadena L (VL M12) de un anticuerpo anti-CD3 (M12), y tenía secuencias complementarias en los extremos. Los oligonucleótidos se diseñaron de manera tal que se vincularían entre sí mediante las porciones de secuencia complementaria por reacción de polimerasa para sintetizar un polinucleótido correspondiente a la región variable de la cadena P (VP M12) y la región variable de la cadena L (VL M12). Los oligonucleótidos se mezclaron y luego se ensamblaron juntos mediante PCR para dar dos ADNc que codifican las secuencias de aminoácidos de las regiones variables respectivas. La PCR se realizó utilizando cebadores que contienen secuencias adicionales apropiadas y los ADNc anteriores como plantillas para producir un fragmento de ADNc que codifica scFv M12 que tiene una secuencia amino en la que VL M12 y VP M12 se vincularon mediante un enlazador que tiene tres repeticiones de Gly-Gly-Gly Gly-Ser (SEQ ID NO: 7).

45 A continuación, mediante PCR utilizando cebadores que contienen secuencias adicionales apropiadas y los fragmentos de ADNc que codifican scFv anti-GPC3 o scFv M12 como plantillas, se construyó un fragmento de ADNc que codificaba una secuencia de aminoácidos en la que se vincularon scFv anti-GPC3 y scFv M12 mediante un enlazador compuesto por Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 7) y su extremo C-terminal tenía una etiqueta His (ocho histidinas) (la secuencia de la SEQ ID NO: 33 sin su amino terminal 19 aminoácidos).

55 Utilizando cebadores que contienen secuencias adicionales apropiadas y como plantilla, el fragmento de ADNc que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33 que carece de sus 19 aminoácidos amino terminales, se realizó una PCR para producir un fragmento de ADNc en el que una secuencia de escisión *EcoRI*, secuencia *kozac*, y una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de señal de secreción se fijaron al extremo 5' del fragmento de ADNc anterior y una secuencia de escisión *NotI* al extremo 3'. El fragmento de ADNc resultante se

escindió con *EcoRI* y *NotI*, y se insertó en un vector de expresión de células de mamífero para obtener un vector de expresión para BiTE GPC3 (SEQ ID NO: 33; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirven como una secuencia de señal).

5 El vector se introdujo en células CHO DG44 por electroporación. Después de limitar la dilución, las células se cultivaron en presencia de 1 mg/ml de Geneticin para aislar estirpes celulares resistentes a los fármacos. El sobrenadante de cultivo de las estirpes celulares obtenidas se analizó mediante inmunoelectrotransferencia utilizando un anticuerpo de etiqueta anti-His para seleccionar una estirpe celular que expresa BiTE GPC3.

10 El sobrenadante de cultivo obtenido por cultivo celular a gran escala de la estirpe celular descrita anteriormente se cargó en una columna SP sefarosa FF (GE Healthcare). Después de lavar la columna, se eluyó una fracción que contenía BiTE GPC3 con un gradiente de concentración de NaCl. La fracción se cargó en una columna HisTrap HP (GE Healthcare). Después de lavar la columna, se eluyó una fracción que contenía BiTE GPC3 con un gradiente de concentración de imidazol. La fracción se concentró por ultrafiltración y luego el concentrado se cargó en una columna Superdex 200 (GE Healthcare). Sólo se recogió una fracción de BiTE GPC3 monomérica para obtener BiTE GPC3 purificado.

15 (3) Construcción de ERY2 GPC3

La PCR que utiliza cebadores que contienen las mismas secuencias adicionales apropiadas que en el método descrito anteriormente y un método bien conocido por los expertos en la técnica, tal como un método que utiliza el kit de mutagénesis dirigida al sitio de QuikChange (Stratagene), se realizó para producir vectores de expresión para los cuales se insertó un polinucleótido que codifica GPC3 ERY2_Hk (SEQ ID NO: 34; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirven como una secuencia de señal) o GPC3 ERY2_Hh (SEQ ID NO: 35; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirven como una secuencia de señal).

25 Estos vectores de expresión fueron co-introducidos en células FreeStyle293-F (Invitrogen) para expresar ERY2 GPC3 de forma transitoria. El sobrenadante de cultivo resultante se cargó en una columna Anti FLAG M2 (Sigma). Después del lavado, la columna se eluyó con 0,1 mg/ml de péptido FLAG (Sigma). Una fracción que contenía ERY2 GPC3 se cargó en una columna HisTrap HP (GE Healthcare). Después del lavado, la columna se eluyó con un gradiente de concentración de imidazol. Una fracción que contenía ERY2 GPC3 se concentró por ultrafiltración y el concentrado se cargó en una columna Superdex 200 (GE Healthcare). Solamente se recogió una fracción monomérica de ERY2 GPC3 del eluato para obtener ERY2 GPC3 purificado.

(4) Construcción de anticuerpo anti-GPC3 con un contenido bajo en fucosa

30 Se introdujo un vector de expresión para un anticuerpo anti-GPC3 (que se refiere como anticuerpo GC33 humanizado en el documento WO 2006/006693) en las células CHO DXB11 eliminadas con GDP fucosa (*Cancer Sci.* (2010) 101(10), 2227-33) por electroporación. Después de limitar la dilución, las células se cultivaron en presencia de 0.5 mg/ml de Geneticin para seleccionar líneas resistentes al fármaco y se obtuvo una estirpe celular que expresaba un anticuerpo anti-GPC3 con un contenido bajo en fucosa. Del sobrenadante de cultivo obtenido cultivando estas células, se preparó una fracción de anticuerpo mediante purificación por afinidad convencional utilizando proteína A Hitrap® (Pharmacia). Luego, la fracción de anticuerpo se sometió a purificación por filtración en gel utilizando Superdex 20026/60 (Pharmacia). Se recogió una fracción monomérica del eluato para obtener un anticuerpo anti-GPC3 con un contenido bajo en fucosa.

(5) Ensayo de citotoxicidad utilizando células mononucleares de sangre periférica humana

40 (5-1) Preparación de la suspensión de células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP)

De voluntarios sanos (adultos), se extrajeron 50 ml de sangre periférica utilizando jeringas a las que se añadieron por adelantado 100 µl de 1.000 unidades/ml de solución de heparina (5.000 unidades Novo-Heparin para inyección; Novo Nordisk). La sangre periférica se diluyó dos veces con TFS (-), se dividió en cuatro alícuotas iguales y se añadió a los tubos de separación de linfocitos Leucosep (Cat. n.º 227290; Greiner bio-one) que se inyectó con 15 ml de Ficoll-Paque PLUS y se centrifugó previamente. Después de la centrifugación (2.150 rpm, 10 minutos, temperatura ambiente) de los tubos de separación, se recogió una capa de fracción celular mononuclear. Las células en la fracción de células mononucleares se lavaron una vez con medio de Eagle modificado por Dulbecco (SIGMA) que contenía un 10 % de SFB (en adelante referido SFB/D-MEM al 10 %), y luego la densidad celular se ajustó a 4 x 10⁶ células/ml utilizando SFB/D-MEM al 10 %. La suspensión celular preparada de este modo se utilizó como una suspensión de CMSP humanas en experimentos posteriores.

(5-2) Ensayo de actividad citotóxica

La actividad citotóxica se evaluó en función de la tasa de inhibición del crecimiento celular determinada utilizando el analizador de células en tiempo real xCELLigence (Roche Diagnostics). La célula diana utilizada fue la estirpe celular SK-pca13a establecida mediante la expresión forzada de GPC3 humana en la estirpe celular SK-HEP-1. Las células SK-pca13a se separaron de las placas y se sembraron en una placa E-Plate 96 (Roche Diagnostics) a 1 x 10⁴ células/pocillo (100 µl/pocillo). Acto seguido, se inició el ensayo de células viables utilizando el analizador de

células en tiempo real xCELLigence. Al día siguiente, la placa se retiró del analizador celular en tiempo real xCELLigence y se añadieron a la placa 50 µl de cada anticuerpo preparado a diversas concentraciones (0,004, 0,04, 0,4 y 4 nM). Después de 15 minutos de reacción a temperatura ambiente, se añadieron 50 µl de suspensión de CMSP humanas (2 x 10⁵ células/pocillo) preparada en (5-1). La placa se colocó de nuevo en el analizador de células en tiempo real xCELLigence para iniciar un ensayo celular viable. La reacción se llevó a cabo con gas dióxido de carbono al 5 % a 37 °C. La tasa de inhibición del crecimiento celular (%) se determinó según la fórmula que se muestra a continuación utilizando el valor del índice celular a las 72 horas después de la adición de CMSP humanas. El valor del índice celular utilizado en el cálculo se normalizó de tal manera que el valor del índice celular inmediatamente antes de la adición del anticuerpo se tomó como 1.

5 Tasa de inhibición del crecimiento celular (%) = $(A-B) \times 100 / (A-1)$

A indica el valor del índice celular medio para el pocillo sin anticuerpo (sólo la célula diana y las CMSP humanas), mientras que B indica el valor del índice celular medio para cada pocillo. La medición se realizó por triplicado.

15 La actividad citotóxica de BiTE GPC3, ERY2 GPC3 y el anticuerpo de tipo IgG anti-GPC3 se midió utilizando CMSPs (células mononucleares de sangre periférica) preparadas a partir de sangre humana como células efectoras. BiTE GPC3 mostró una actividad muy fuerte (Fig. 1). Esta actividad fue mucho más fuerte que la del anticuerpo anti-GPC3 con un contenido bajo en fucosa. Por lo tanto, BiTE GPC3 puede servir como un excelente agente terapéutico contra el cáncer que supera el anticuerpo de tipo IgG. Por otra parte, la actividad de ERY2 GPC3 no fue tan fuerte como la de BiTE GPC3, aunque fue mayor que la del anticuerpo de tipo IgG anti-GPC3. Esto sugiere que la mera adición de Fc a BiTE no permite la creación de una molécula deseada.

20 [Ejemplo 2] Construcción y evaluación de ERY5 GPC3, ERY6 GPC3 y ERY7 GPC3

A continuación, en un intento por mejorar la actividad específica, el dominio de unión al antígeno canceroso (GPC3) se hizo bivalente para potenciar la actividad de unión de las células cancerosas. Se añadió otro scFv anti-GPC3 a ERY2 GPC3 para construir ERY5 GPC3 (Fig. 17D). Además, en lugar del scFv, se añadió un dominio de unión a GPC3 de tipo Fab para producir ERY7 GPC3 (Fig. 17F). Además, ERY6 GPC3 (Fig. 17E) también se construyó en la que el scFv epsilon anti-CD3 de ERY5 GPC3 se dividió en dos brazos.

25 Específicamente, se realizó un método conocido por los expertos en la técnica, tal como PCR que utiliza cebadores que contienen las mismas secuencias adicionales apropiadas que en el método descrito anteriormente, para producir una serie de vectores de expresión en los que se insertó un polinucleótido que codifica GPC3 ERY5_Hh, GPC3 ERY6_Hk, GPC3 ERY6_Hh, GPC3 ERY7_Hh o GPC3 ERY7_L.

30 Las siguientes combinaciones de vectores de expresión se introdujeron en las células FreeStyle293-F para expresar cada molécula diseñada de forma transitoria.

A. Molécula diseñada: ERY5 GPC3

35 Polipéptidos codificados por polinucleótidos insertados en vectores de expresión: GPC3 ERY5_Hh (SEQ ID NO: 36; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como secuencia de señal) y GPC3 ERY2_Hk.

B. Molécula diseñada: ERY6 GPC3

40 Polipéptidos codificados por polinucleótidos insertados en vectores de expresión: GPC3 ERY6_Hk (SEQ ID NO: 37; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal) y GPC3 ERY6_Hh (SEQ ID NO: 38; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal)

C. Molécula diseñada: ERY7 GPC3

45 Polipéptidos codificados por polinucleótidos insertados en vectores de expresión: GPC3 ERY7_Hh (SEC ID NO: 39; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), GPC3 ERY7_L (SEQ ID NO: 40; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como secuencia de señal), y GPC3 ERY2_Hk.

50 El sobrenadante de cultivo resultante se cargó en una columna Anti FLAG M2 (Sigma). Después del lavado, la columna se eluyó con 0,1 mg/ml de péptido FLAG (Sigma). Una fracción que contenía la molécula diseñada se cargó en una columna HisTrap HP (GE Healthcare). Después del lavado, la columna se eluyó con un gradiente de concentración de imidazol. Una fracción que contenía la molécula diseñada se concentró por ultrafiltración. Luego, la fracción se cargó en una columna Superdex 200 (GE Healthcare). Solamente se recogió una fracción de monómero del eluato para obtener cada molécula diseñada purificada.

Estos complejos polipeptídicos se compararon con BiTE GPC3 en términos de actividad citotóxica. El resultado mostró que la actividad citotóxica de estos complejos polipeptídicos no era tan alta como la de BiTE GPC3 (Figs. 2 a 4). Este hallazgo sugiere que la adición de Fc a la estructura BiTE o su estructura mimética y la configuración que

permite la unión bivalente a un antígeno canceroso no permiten la creación de una molécula deseada.

[Ejemplo 3] Construcción y evaluación de ERY8-2 GPC3, ERY9-1 GPC3 y ERY10-1 GPC3

(1) Construcción de ERY8-2 GPC3, ERY9-1 GPC3 y ERY10-1 GPC3

A continuación, se diseñaron moléculas que no tienen estructura BiTE pero que poseen la actividad deseada. Se utilizó un antígeno de IgG anti-cancerígeno (GPC3) como cadena principal, y se construyó una molécula en la que se añadió un scFv épsilon anti-CD3 a esta cadena principal. El Fc de IgG utilizado como cadena principal era un Fc silencioso que tenía una actividad de unión a FcγR (receptor Fcγ) reducida, como en los casos descritos anteriormente. Se construyeron ERY8-2 GPC3 (Fig. 17G), ERY10-1 GPC3 (Fig. 17I), y ERY9-1 GPC3 (Fig. 17H) en los que el scFv épsilon anti-CD3 se fijó al extremo N-terminal de la cadena P, el extremo C-terminal de la cadena P y el extremo C-terminal de la cadena L del anticuerpo de IgG anti-GPC3, respectivamente.

Específicamente, mediante un método conocido por los expertos en la técnica, tal como la PCR que utiliza cebadores que contienen las mismas secuencias adicionales apropiadas que en el método descrito anteriormente, se construyeron una serie de vectores de expresión en los que se insertó un polinucleótido que codifica GPC3 ERY8-2_Hk (SEQ ID NO: 41; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), GPC3 ERY8-2_Hh (SEQ ID NO: 42; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como secuencia de señal), GPC3 ERY9-1_H (SEQ ID NO: 43; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como secuencia de señal), GPC3 ERY9-1_L-His (SEQ ID NO: 44; la secuencia madura no contiene los aminoácidos 19 amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), GPC3 ERY9-1_L-FLAG (SEQ ID NO: 45; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), o GPC3 ERY10-1_Hh (SEQ ID NO: 46; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal).

Las siguientes combinaciones de vectores de expresión se introdujeron en las células FreeStyle293-F para expresar cada molécula diseñada de forma transitoria.

D. Molécula diseñada: ERY8-2 GPC3

Polipéptidos codificados por polinucleótidos insertados en vectores de expresión: GPC3 ERY8-2_Hk (SEQ ID NO: 41; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), GPC3 ERY8-2_Hh (SEQ ID NO: 42; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), y GPC3 ERY7_L.

E. Molécula diseñada: ERY9-1 GPC3

Polipéptidos codificados por polinucleótidos insertados en vectores de expresión: GPC3 ERY9-1_H (SEQ ID NO: 43; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), GPC3 ERY9-1_L-His (SEQ ID NO: 44; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), y GPC3 ERY9-1_L-FLAG (SEQ ID NO: 45; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal).

F. Molécula diseñada: ERY10-1 GPC3

Polipéptidos codificados por polinucleótidos insertados en vectores de expresión: GPC3 ERY10-1_Hh (SEQ ID NO: 46; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal) y GPC3 ERY8-2_Hk, GPC3 ERY7_L.

El sobrenadante de cultivo resultante se cargó en una columna Anti FLAG M2 (Sigma). Después del lavado, la columna se eluyó con 0,1 mg/ml de péptido FLAG (Sigma). Una fracción que contenía la molécula diseñada se cargó en una columna HisTrap HP (GE Healthcare). Después del lavado, la columna se eluyó con un gradiente de concentración de imidazol. Una fracción que contenía la molécula diseñada se concentró por ultrafiltración. Luego, la fracción se cargó en una columna Superdex 200 (GE Healthcare). Solamente se recogió una fracción de monómero del eluato para obtener cada molécula diseñada purificada.

Estas moléculas se evaluaron para determinar la actividad citotóxica *in vitro*. El resultado reveló que todas las moléculas exhibieron una actividad citotóxica comparable o mayor a la de BiTE GPC3 (Fig. 5). En particular, se descubrió que ERY9-1 GPC3 y ERY10-1 GPC3 tienen claramente una mayor actividad citotóxica que BiTE GPC3. La presente invención demuestra por primera vez que las moléculas creadas mediante la adición de un scFv epsilon anti-CD3 a una IgG antigénica anti-cancerígena también tienen una actividad citotóxica comparable o mayor que la de BiTE. Particularmente, es sorprendente que las moléculas como ERY9-1 GPC3 y ERY10-1 GPC3 exhibieran claramente una mayor actividad citotóxica que BiTE, aunque existía una gran distancia entre su dominio de unión al antígeno canceroso y el dominio de unión a épsilon CD3.

(2) Evaluación de la eficacia *in vivo* de ERY8-2 GPC3 y ERY10-1GPC3:

ERY8-2 GPC3 y ERY10-1 GPC3, que demostraron tener una actividad citotóxica comparable o mayor a la de BiTE

GPC3 en el ensayo *in vitro* descrito en (1), se evaluaron para determinar la eficacia *in vivo*. Las células de la estirpe celular PC-10 de cáncer de pulmón humano que expresan GPC3 se mezclaron con CMSP humanas, y después se transplantaron a ratones scid NOD. Los ratones se trataron administrando ERY8-2 GPC3 o ERY10-1 GPC3 (denominado modelo de premezcla).

- 5 Específicamente, el ensayo de eficacia para ERY8-2 GPC3 utilizando el modelo de premezcla PC-10 se realizó de la siguiente manera. Las CMSP se aislaron de la sangre extraída de voluntarios sanos. Las células NK se eliminaron de las CMSP utilizando microesferas CD56, humanas (MCAS Miltenyi biotec). La estirpe celular de carcinoma escamoso de pulmón humano PC-10 (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.) (5×10^6 células), CMSP humanas sin células NK ($4,5 \times 10^6$ células) y matriz de membrana Matrigel Basement (BD) se mezclaron y luego se
- 10 transplantaron por vía subcutánea a la región inguinal de ratones scid NOD (CLEA Japan Inc.; hembra, 7 semanas). El día del trasplante fue designado el día 0. El día antes del trasplante, se administró por vía intraperitoneal un anticuerpo anti-asialo GM1 (Wako Pure Chemical Industries) a los ratones a 0,2 mg/cabeza. Después de dos horas de trasplante, se administró por vía intraperitoneal ERY8-2 GPC a 30 $\mu\text{g}/\text{cabeza}$. ERY8-2 GPC se administró cinco veces en total durante el periodo de días 0 a 4.
- 15 Además, el ensayo de eficacia para ERY10-1 GPC3 utilizando el modelo de premezcla PC-10 se realizó de la siguiente manera. Las CMSP se aislaron de la sangre extraída de voluntarios sanos. Las células NK se eliminaron de las CMSP utilizando microesferas CD56, humanas (MCAS Miltenyi biotec). La estirpe celular de carcinoma escamoso de pulmón humano PC-10 (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.) (5×10^6 células), CMSP humanas sin células NK ($4,5 \times 10^6$ células) y matriz de membrana Matrigel Basement (BD) se mezclaron y luego se
- 20 transplantaron por vía subcutánea a la región inguinal de ratones scid NOD (CLEA Japan Inc.; hembra, 7 semanas). El día del trasplante fue designado el día 0. El día anterior al trasplante, se administró por vía intraperitoneal a los ratones un anticuerpo anti-asialo-GM1 (Wako Pure Chemical Industries) a 0,2 mg/cabeza. Después de dos horas de trasplante, se administró por vía intraperitoneal ERY10-1 GPC a 30 $\mu\text{g}/\text{cabeza}$. ERY10-1 GPC se administró 13 veces en total durante los periodos de los días 0 a 4, los días 7 a 11 y los días 14 a 16.
- 25 El resultado mostró que en los grupos de administración ERY8-2 GPC3 y ERY10-1 GPC3, el crecimiento del tumor se suprimió claramente en comparación con el grupo de administración de disolvente (TFS) (Figs. 6 y 7).

Además, ERY10-1 GPC3 también se evaluó para la eficacia *in vivo* utilizando un modelo alternativo. Específicamente, las células T se cultivaron cultivando CMSP humanas *in vitro* y luego se introdujeron en ratones scid NOD que habían desarrollado tumores originados a partir de PC-10 trasplantado. Los ratones se trataron administrando ERY10-1 GPC3 (denominado modelo de transferencia de células T).

- 30 Específicamente, el ensayo de eficacia para ERY10-1 GPC3 utilizando el modelo de transferencia de células T PC-10 se realizó de la siguiente manera. El cultivo de expansión de células T se llevó a cabo utilizando un kit de activación/expansión de células T/humano (MACS Miltenyi biotec) y CMSP aisladas de sangre extraída de voluntarios sanos. Las células PC-10 de la estirpe celular de carcinoma escamoso de pulmón humano (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.) (1×10^7 células) se mezclaron con matriz de membrana Matrigel Basement (BD), y luego se transplantaron subcutáneamente a la región inguinal de ratones scid NOD (CLEA Japan Inc.; hembra, 7
- 35 semanas). El día del trasplante fue designado el día 0. El día antes del trasplante y los días 6, 8, 12, 16 y 20, se administró por vía intraperitoneal a los ratones un anticuerpo anti-asialo-GM1 (Wako Pure Chemical Industries) a 0,2 mg/cabeza. En el día 6 de trasplante, los ratones se agruparon por el tamaño del tumor y el peso corporal, y luego las células T preparadas por cultivo de expansión como se ha descrito anteriormente se transplantaron a 1×10^7
- 40 células/cabeza en la cavidad peritoneal. Después de dos horas de trasplante, se administró ERY10-1 GPC por vía intraperitoneal a 30 $\mu\text{g}/\text{cabeza}$. ERY10-1 GPC se administró cinco veces en total en los días 7, 8, 12, 16 y 17.

El resultado mostró que el grupo de administración ERY10-1 GPC3 de este modelo también exhibió un claro efecto antitumoral en comparación con el grupo de administración de disolvente (Fig. 8).

- 45 El hallazgo descrito anteriormente demuestra que una serie de moléculas en las que se añade un scFv de un anticuerpo épsilon anti-CD3 a una cadena principal de IgG que tiene un Fc silencioso exhibe un efecto anti-tumoral *in vivo*.

(3) Evaluación de la retención de plasma.

- 50 Con el fin de evaluar si las moléculas tales como ERY8-2 GPC3, ERY9-1 GPC3 y ERY10-1 GPC3 tienen una semivida en plasma considerablemente mayor que BiTE GPC3, ERY9-1 GPC3 y ERY10-1 GPC3 se administraron a 30 $\mu\text{g}/\text{cabeza}$ a ratones scid NOD a los que no se les habían trasplantado células cancerosas y se midieron sus concentraciones plasmáticas con el tiempo.

- 55 Específicamente, el análisis de PK se llevó a cabo de la siguiente manera. ERY9-1 GPC3 y ERY10-1 GPC3 se administraron por vía intraperitoneal a ratones scid NOD (CLEA Japan Inc.; hembra, 8 semanas) a 30 $\mu\text{g}/\text{cabeza}$. La sangre se extrajo de la vena bucal de los ratones utilizando capilares de hematocrito (Terumo) a los 15 minutos, dos horas, 1 día, 2 días y 7 días después de la administración. El plasma se preparó a partir de la sangre.

ERY9-1 GPC3 y ERY10-1 GPC3 se diluyeron apropiadamente y se añadieron a las células Ba/F3 que expresan

GPC3 (GPC3/BaF) o a las células Ba/F3 que expresan épsilon CD3 (CD3/BaF) para permitir que ERY9-1 GPC3 o ERY10-1 GPC3 reaccionen con GPC3/BaF y CD3/BaF. Después de lavar estas células, se añadió un anticuerpo secundario marcado con FITC para una reacción adicional. Después de lavar las células, la intensidad de fluorescencia de la etiqueta en las células se midió utilizando un citómetro de flujo Epics XL (Beckman Coulter) para preparar una curva de calibración para cada anticuerpo.

Con el tiempo, se extrajo sangre de los ratones a los que se les había administrado ERY9-1 GPC3 o ERY10-1 GPC3. El plasma se preparó a partir de la sangre y se diluyó apropiadamente. De la misma manera que para la preparación de las curvas de calibración descritas anteriormente, las muestras de plasma se hicieron reaccionar con GPC3/BaF o CD3/BaF para determinar la cantidad de plasma ERY9-1 GPC3 y ERY10-1 GPC3 unida a cada célula. La concentración plasmática de cada anticuerpo se calculó utilizando valores determinados y las curvas de calibración descritas anteriormente.

El resultado mostró que la concentración en sangre de ERY9-1 GPC3 y ERY10-1 GPC3 permaneció superior a 10 nM después de dos días de la administración (Figs. 9 y 10). Este hallazgo demuestra que las moléculas como ERY9-1 GPC3 y ERY10-1 GPC3 tienen una semivida plasmática significativamente mejorada en comparación con BiTE.

(4) Efecto de Fc silencioso en la inducción de citoquinas independiente del antígeno canceroso

(4-1) Construcción de ERY15-1 GPC3 con Fc de unión a FcγR

ERY15-1 GPC3 que tiene un Fc de unión a FcγR (Fig. 17J) se construyó para someter a ensayo si las moléculas tales como ERY8-2GPC3, ERY9-1 GPC3 y ERY10-1 GPC3 inducirían citoquinas de manera independiente del antígeno canceroso.

Específicamente, como en el método descrito anteriormente, la PCR que utiliza cebadores que contienen secuencias adicionales apropiadas y un método conocido por los expertos en la técnica, tal como un método que utiliza el kit de mutagénesis dirigida al sitio de QuikChange (Stratagene), se realizó para construir vectores de expresión en los cuales se insertó un polinucleótido que codifica GPC3 ERY15-1_Hh (SEQ ID NO: 47; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal) o GPC3 ERY15-1_Hk (SEQ ID NO: 48; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirven como una secuencia de señal).

Los vectores de expresión para GPC3 ERY15-1_Hh (SEQ ID NO: 47; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), GPC3 ERY15-1_Hk (SEQ ID NO: 48; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), y ERY7_L GPC3 se co-introdujeron en las células FreeStyle293-F para expresar ERY15-1 GPC3 de forma transitoria. El sobrenadante de cultivo resultante se cargó en una columna Anti FLAG M2 (Sigma). Después del lavado, la columna se eluyó con 0,1 mg/ml de péptido FLAG (Sigma). Una fracción que contenía ERY15-1 GPC3 se cargó en una columna HisTrap HP (GE Healthcare). Después del lavado, la columna se eluyó con un gradiente de concentración de imidazol. Una fracción que contenía ERY15-1 GPC3 se concentró por ultrafiltración. Luego, la fracción se cargó en una columna Superdex 200 (GE Healthcare). Sólo se recogió una fracción monomérica de ERY15-1 GPC3 del eluato para obtener ERY15-1 GPC3 purificado.

(4-2) Ensayo de la capacidad inductora de citoquinas independiente del antígeno canceroso

La capacidad inductora de citoquinas independiente del antígeno canceroso de ERY15-1 GPC3 se comparó con las de BiTE GPC3, ERY9-1 GPC3, ERY10-1 GPC3 y catumaxomab. Utilizando el método descrito anteriormente, se prepararon CMSP a partir de sangre extraída de voluntarios sanos. Se añadieron cincuenta µl de cada anticuerpo ajustado a 40 nM a 50 µl de suspensión de CMSP humanas (2×10^5 células/pocillo), y luego se añadieron 100 µl de SFB al 10 %/D-MEM. La mezcla de reacción se incubó con gas dióxido de carbono al 5 % a 37 °C. Después de 72 horas de incubación, se recogió el sobrenadante de cultivo y se cuantificaron las citoquinas secretadas en el sobrenadante de cultivo mediante un ensayo matriz de perlas citométricas (MPC) utilizando el kit Th1/Th2/Th17 humano (BD). El ensayo se llevó a cabo por triplicado por el método según el protocolo adjunto.

Como resultado, ERY15-1 GPC3 y catumaxomab, que tienen un Fc de unión a FcγR, mostraron una clara inducción de citoquinas. Por el contrario, no se observó inducción de citoquinas para BiTE GPC3, que no tiene Fc, y ERY9-1 GPC3 y ERY10-1 GPC3, que poseen un Fc silencioso (Fig. 11). Este resultado sugiere que las moléculas que tienen un Fc silencioso como ERY8-2 GPC3, ERY9-1 GPC3 y ERY10-1 GPC3 son moléculas altamente seguras que no inducen citoquinas de forma independiente del antígeno canceroso.

[Ejemplo 4] Construcción y evaluación de ERY18 L1, L2, L3, L4 y S1 GPC3

Se evaluaron las moléculas que tienen un dominio de unión a CD3 diferente de la estructura scFv. Se construyó ERY18 GPC3 (Fig. 17K) en el que los dominios VP y VL de un anticuerpo anti-CD3 se vincularon a los extremos C-terminales de las dos cadenas P de una IgG antigénica anti-cancerígena (GPC3). En esta construcción, se produjeron una serie de moléculas (ERY18 L1, L2, L3 y L4 GPC3) que tienen de una a cuatro unidades enlazadoras

(Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) en la unión. Al mismo tiempo, se construyó otra molécula (ERY18 S1 GPC3) en la que los aminoácidos en las posiciones apropiadas se sustituyeron con Cys para permitir la introducción de un enlace disulfuro.

5 Específicamente, se realizó un método conocido por los expertos en la técnica, como la PCR que utiliza cebadores que contienen secuencias adicionales apropiadas como en el método descrito anteriormente, para construir una serie de vectores de expresión en los que se insertó un polinucleótido que codifica GPC3 ERY18 L1_Hh (SEQ ID NO: 49; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), GPC3 ERY18 L1_Hk (SEQ ID NO: 50; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como secuencia de señal), GPC3 ERY18 L2_Hh (SEQ ID NO: 51; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como secuencia de señal), GPC3 ERY18 L2_Hk (SEQ ID NO: 52; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), GPC3 ERY18 L3_Hh (SEQ ID NO: 53; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señales), GPC3 ERY18 L3_Hk (SEQ ID NO: 54; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), GPC3 ERY18 L4_Hh (SEQ ID NO: 55; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), GPC3 ERY18 L4_Hk (SEQ ID NO: 56; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), GPC3 ERY18 S1_Hh (SEQ ID NO: 57; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como secuencia de señal), o GPC3 ERY18 S1_Hk (SEA ID NO: 58; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal).

Las siguientes combinaciones de vectores de expresión se introdujeron en las células FreeStyle293-F para expresar cada molécula diseñada de forma transitoria.

G. Molécula diseñada: ERY18 L1 GPC3

25 Vectores de expresión: GPC3 ERY18 L1_Hh (SEQ ID NO: 49; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una señal de secuencia), GPC3 ERY18 L1_Hk (SEQ ID NO: 50; la secuencia madura no contiene los aminoácidos 19 amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), y ERY7 L GPC3.

H. Molécula diseñada: ERY18 L2 GPC3

30 Vectores de expresión: GPC3 ERY18 L2_Hh (SEQ ID NO: 51; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una señal de secuencia), GPC3 ERY18 L2_Hk (SEQ ID NO: 52; la secuencia madura no contiene los aminoácidos 19 amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), y ERY7 L GPC3.

I. Molécula diseñada: ERY18 L3 GPC3

35 Vectores de expresión: GPC3 ERY18 L3_Hh (SEQ ID NO: 53; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), GPC3 ERY18 L3_Hk (SEQ ID NO: 54; la secuencia madura no contiene los aminoácidos 19 amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), y ERY7 L GPC3.

J. Molécula diseñada: ERY18 L4 GPC3

40 Vectores de expresión: GPC3 ERY18 L4_Hh (SEQ ID NO: 55; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), GPC3 ERY18 L4_Hk (SEQ ID NO: 56; la secuencia madura no contiene los aminoácidos 19 amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), y ERY7 L GPC3.

K. Molécula diseñada: ERY18 S1 GPC3

45 Vectores de expresión: GPC3 ERY18 S1_Hh (SEQ ID NO: 57; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), GPC3 ERY18 S1_Hk (SEQ ID NO: 58; la secuencia madura no contiene los aminoácidos 19 amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), y ERY7 L GPC3.

50 El sobrenadante de cultivo resultante se cargó en una columna Anti FLAG M2 (Sigma). Después del lavado, la columna se eluyó con 0,1 mg/ml de péptido FLAG (Sigma). Una fracción que contenía la molécula diseñada se cargó en una columna HisTrap HP (GE Healthcare). Después del lavado, la columna se eluyó con un gradiente de concentración de imidazol. Una fracción que contenía la molécula diseñada se concentró por ultrafiltración. Luego, la fracción se cargó en una columna Superdex 200 (GE Healthcare). Solamente se recogió una fracción de monómero del eluato para obtener cada molécula diseñada purificada.

Las moléculas ERY18 L1 GPC3, ERY18L2 GPC3, ERY18L3 GPC3, ERY18L4 GPC3 y ERY18S1 GPC3 se

evaluaron para determinar su actividad citotóxica *in vitro* (Figs. 12 y 13). El resultado mostró que todas las moléculas, excepto ERY18 L1 GPC3, tenían una actividad comparable a la de ERY10-1 GPC3. Este resultado demuestra que las moléculas que tienen una estructura sin scFv tienen una actividad citotóxica comparable. Se espera que la estructura en la que los dominios VP y VL del anticuerpo CD3 están vinculados al extremo C-terminal de dos cadenas P de una IgG antigénica anti-cancerígena (GPC3) contribuya a la estabilización de los complejos polipeptídicos de la presente invención.

[Ejemplo 5] Construcción y evaluación de ERY19-3 GPC3

A continuación, se evaluaron las moléculas que tienen un dominio de unión a CD3 tipo Fab. Se construyó ERY19-3 GPC3 (Fig. 17L) en el que los dominios VP y CH1, y los dominios VL y CL del anticuerpo CD3 se vincularon cada uno al extremo C-terminal de las dos cadenas P de un anticuerpo IgG antigénica cancerosa (GPC3). Específicamente, mediante un método conocido por los expertos en la técnica, como la PCR que utiliza cebadores que contienen secuencias adicionales apropiadas de la misma manera que en el método descrito anteriormente, se construyeron vectores de expresión en los que se insertó un polinucleótido que codifica GPC3 ERY19-3_Hh (SEQ ID NO: 59; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal) o GPC3 ERY19-3_Hk (SEQ ID NO: 60; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal).

Los vectores de expresión para GPC3 ERY19-3_Hh (SEQ ID NO: 59; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), GPC3 ERY19-3_Hk (SEQ ID NO: 60; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), y ERY7_L GPC3 se co-introdujeron en células FreeStyle293-F para expresar ERY19-3 GPC3 de forma transitoria. El sobrenadante de cultivo resultante se cargó en una columna HiTrap rProtein A FF (GE Healthcare). Después del lavado, la columna se eluyó con un ácido. Una fracción que contenía ERY19-3 GPC3 se concentró por ultrafiltración y luego se cargó en una columna Superdex 200 (GE Healthcare). Solo se obtuvo una fracción monomérica de ERY19-3 GPC3 del eluato para obtener ERY19-3 GPC3 purificado.

La molécula ERY19-3 GPC3 se evaluó para determinar su actividad citotóxica *in vitro*. El resultado mostró que la molécula tenía una actividad comparable a BiTE GPC3 (Fig. 14). Se espera que el dominio de unión a CD3 con una estructura similar a Fab contribuya a la estabilización de las moléculas del complejo polipeptídico de la presente invención.

[Ejemplo 6] Preparación de complejos polipeptídicos utilizando una etapa de purificación de proteína A sola mediante la introducción de una mutación en el dominio CH3 de ERY 10-1 GPC3

(1) Esbozo

En ERY10-1 GPC3 preparado en el Ejemplo 3, el dominio CH3 tiene la estructura de botones en ojales. La molécula ERY10-1 GPC3 deseada, en la que las dos cadenas P se asociaron heteroméricamente entre sí, se purificó mediante dos tipos de purificación por afinidad utilizando la etiqueta His y la etiqueta FLAG fijadas al extremo C-terminal de cada cadena P. Si la molécula ERY10-1 GPC3 se produce como un producto farmacéutico, la cromatografía de proteína A se realiza primero en el sobrenadante de cultivo de células que expresan ERY10-1 GPC3 para purificar un complejo polipeptídico que tiene un dominio Fc. Esta etapa debe ir seguida de una etapa de purificación cromatográfica adicional utilizando la cromatografía por afinidad con etiqueta His y la cromatografía por afinidad con etiqueta FLAG. Esto se traduce en un aumento de los costos para el proceso de purificación. Por lo tanto, este Ejemplo examinó modificaciones moleculares que permiten la purificación de la molécula ERY10-1 GPC3 deseada que tiene las dos cadenas P asociadas heteroméricamente mediante solo cromatografía de proteína A sin utilizar una etiqueta His y una etiqueta FLAG.

Específicamente, se examinaron las modificaciones para eliminar la unión de la proteína A en una de las dos cadenas P. Como resultado de dichas modificaciones, cuando las cadenas P que no se unen a la proteína A están asociadas homoméricamente, la molécula no puede unirse a la proteína A y, por lo tanto, pasa a través de la cromatografía de proteína A. Por otra parte, una molécula en la que una cadena P que no se une a la proteína A está asociada heteroméricamente con una cadena P que se une a la proteína A, y una molécula en la que las cadenas P que se unen a la proteína A están asociadas homoméricamente, se puede separar utilizando cromatografía de proteína A basada en la diferencia en la afinidad para la proteína A. Sin embargo, en el dominio Fc del anticuerpo, el sitio de unión para la proteína A se superpone con el sitio de unión para FcRn, que es crucial para la retención en plasma del anticuerpo. Por lo tanto, es necesario reducir selectivamente solo la actividad de unión a la proteína A, mientras se mantiene la actividad de unión a FcRn. Como tal modificación, se descubrió la sustitución de His en la posición 435 (numeración de la UE) con Arg. La combinación de esta mutación con las mutaciones descritas en el documento WO 2006/106905 (sustituyendo Asp en la posición 356 (numeración de la UE) en una de las cadenas P con Lys, y Lys en la posición 439 (numeración de la UE) en la otra cadena P con Glu), que promueve la asociación heteromérica de las dos cadenas P, se probó si se podía permitir la purificación de complejos polipeptídicos tales como ERY10-1 GPC3 utilizando solo la cromatografía de proteína A.

(2) Construcción de vectores de expresión génica de anticuerpos y expresión de anticuerpos respectivos.

Para la región variable de la cadena P del anticuerpo, se construyó un gen que codifica GC33 (2)H (región variable de la cadena P del anticuerpo glicoproteína-3 antihumano, SEQ ID NO: 61; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos del amino terminales, que sirve como una secuencia de señal) mediante un método conocido por los expertos en la técnica. De manera similar, para la cadena L del anticuerpo, se construyó un gen que codifica GC33-k0 (cadena L del anticuerpo glicoproteína-3 antihumano, SEQ ID NO: 62; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal) por un método conocido por los expertos en la técnica. A continuación, para la región constante de la cadena P del anticuerpo, los genes descritos a continuación se construyeron mediante un método conocido por los expertos en la técnica.

L. Molécula diseñada: LALA-G1d

- 10 LALA-G1d (SEQ ID NO: 63; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), en la que Leu en las posiciones 234 y 235 (numeración de la UE) ha sido sustituido con Ala, Asn en la posición 297 se ha sustituido con Ala, y Gly y Lys en el extremo C-terminal se ha eliminado en la secuencia de IgG1.

M. Molécula diseñada: LALA-G1d-CD3

- 15 LALA-G1d-CD3 (SEQ ID NO: 64; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), en la que un scFv CD3 (región variable de la cadena P del anticuerpo CD3 antihumano y la región variable de la cadena L del anticuerpo CD3 antihumano se vinculan entre sí mediante un enlazador polipeptídico) se ha vinculado al extremo C-terminal de LALA-G1d (SEQ ID NO: 63; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal).

- 20 N. Molécula diseñada: LALA-G3S3E-G1d

LALA-G3S3E-G1d (SEQ ID NO: 65; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), en la cual His en la posición 435 (numeración de la UE) ha sido sustituido con Arg, y Lys en la posición 439 (numeración de la UE) se ha sustituido con Glu en la secuencia de LALA-G1d (SEQ ID NO: 63; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal).

O. Molécula diseñada: LALA-S3K-G1d-CD3

- 30 LALA-S3K-G1d-CD3 (SEQ ID NO: 66; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), en la que Asp en la posición 356 (numeración de la UE) ha sido sustituida con Lys en la secuencia de LALA-G1d-CD3 (SEQ ID NO: 64; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal).

Los genes de la cadena P del anticuerpo GPC3 anti-humano NTA1L y NTA1R se construyeron vinculando LALA-G1d-CD3 o LALA-G1d corriente abajo de GC33(2)H, respectivamente. Mientras tanto, los genes de la cadena P del anticuerpo GPC3 anti-humano NTA2L y NTA2R se construyeron vinculando LALA-S3K-G1d-CD3 o LALA-G3S3E-G1d corriente abajo de GC33(2)H, respectivamente.

- 35 Los vectores de expresión para NTA1L, NTA1R, NTA2L, NTA2R (cadenas P) y GC33-k0 (cadena L) se construyeron insertando cada gen en un vector de expresión de células animales. Estos vectores se combinaron como se muestra a continuación y se introdujeron en células FreeStyle293 (Invitrogen) mediante un método conocido por los expertos en la técnica para expresar de forma transitoria los complejos polipeptídicos descritos a continuación. Como se muestra a continuación, se hace referencia a los complejos polipeptídicos por los nombres de genes introducidos combinados en el orden de [primera cadena P/segunda cadena P/cadena L].

NTA1L/NTA1R/GC33-k0
NTA2L/NTA2R/GC33-k0

(3) Purificación de muestras expresadas y evaluación de la formación de complejos heteroméricos

- 45 El sobrenadante de cultivo de células FreeStyle293 (en lo sucesivo denominado CM) que contiene un complejo polipeptídico mostrado a continuación se utilizó como una muestra.

NTA1L/NTA1R/GC33-k0
NTA2L/NTA2R/GC33-k0

- 50 El CM se filtró a través de un filtro de $\Phi 0,22 \mu\text{m}$ y se cargó en una columna de flujo rápido de sefarosa y proteína A r (GE Healthcare) equilibrada con D-TFS. Las etapas de lavado 1 y 2 y la etapa de elución 1 se llevaron a cabo utilizando los tampones mostrados en la Tabla 1. La cantidad de carga de CM se ajustó de modo que la cantidad de carga de anticuerpo fuera 20 mg/ml de resina. Las fracciones eluidas se recogieron y analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaños para identificar los componentes en las fracciones.

[Tabla 1]

EQUILIBRIO	D-TFS
LAVADO 1	Acetato de sodio 1 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5
LAVADO 2	HCl 0,3 mM, NaCl 150 mM, pH 3,7
ELUCIÓN 1	HCl 2 mM, pH2,7

El resultado del análisis por cromatografía de exclusión por tamaños de cada fracción eluida se muestra en la Fig. 15 y en la Tabla 2. Los valores indican el porcentaje de área de pico de elución. Cuando se expresó NTA1L/NTA1R/GC33-k0 o NTA2L/NTA2R/GC33-k0, el anticuerpo homomérico anti-GPC3 (NTA1L/GC33-k0 o NTA2L/GC33-k0) era casi indetectable en CM. Mientras tanto, el anticuerpo homomérico anti-GPC3 (NTA2R/GC33-k0) fue solo de aproximadamente 2 % en CM donde se expresó NTA2L/NTA2R/GC33-k0, mientras que fue de aproximadamente 76 % en CM donde se expresó NTA1L/NTA1R/GC33-k0. Este resultado demuestra que, cuando His en la posición 435 (numeración de la UE) se sustituye con Arg y, para permitir la formación eficiente de la molécula heteromérica de las respectivas cadenas P, Asp en la posición 356 (numeración de la UE) en la secuencia polipeptídica de una de las cadenas P está sustituida con Lys y Lys en la posición 439 (numeración de la UE) en la secuencia polipeptídica de la otra cadena P está sustituida con Glu, los complejos polipeptídicos heteroméricos que tienen la misma forma molecular que ERY10-1 GPC3 se pueden purificar de manera eficiente con una pureza de más del 98 % solo mediante la etapa de purificación utilizando la proteína A.

[Tabla 2]

	anticuerpo homomérico CD3	anticuerpo heteromérico	anticuerpo homomérico GPC3
NTA1L/NTA1R/GC33-k0	0,7	23,5	75,8
NTA2L/NTA2R/GC33-k0	-	98,2	1,8

15

[Ejemplo 7] Construcción y evaluación de ERY 17-2 GPC3 y ERY 17-3 GPC3

(1) Construcción de ERY 17-2 GPC3 y ERY 17-3 GPC3

A continuación, se construyó una molécula utilizando una IgG antigénica anti-cancerígena (GPC3) como una cadena principal y sustituyendo uno de los Fab con un dominio de unión a épsilon CD3. Como en los casos descritos anteriormente, el Fc de la IgG de la cadena principal era un Fc silencioso que tenía una actividad de unión a FcγR (receptor Fcγ) reducida. Para los dominios de unión a épsilon CD3, los dominios VP y VL de Fab de épsilon anti-CD3 se intercambiaron para producir ERY17-2 GPC3 (Fig. 19A), y los dominios CH1 y CL se intercambiaron para producir ERY17-3 GPC3 (Fig. 19B).

Específicamente, mediante un método conocido por los expertos en la técnica, como la PCR que utiliza cebadores que contienen las mismas secuencias adicionales apropiadas que en el método descrito anteriormente, se construyeron una serie de vectores de expresión en los que se insertó un polinucleótido que codifica ERY17-2_Hh (SEQ ID NO: 73; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), ERY17-2_L (SEQ ID NO: 74; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), ERY17-3_Hh (SEQ ID NO: 75; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), o ERY17-3_L (SEQ ID NO: 76; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal).

Las siguientes combinaciones de vectores de expresión se introdujeron en las células FreeStyle293-F para expresar cada molécula diseñada de forma transitoria.

P. Molécula diseñada: ERY17-2GPC3

Polipéptidos codificados por polinucleótidos insertados en vectores de expresión: GPC3 ERY8-2_Hk, GPC3 ERY7_L, ERY17-2_Hh (SEQ ID NO: 73; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una señal de secuencia), y ERY17-2_L (SEQ ID NO: 74; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal).

Q. Molécula diseñada: ERY17-3 GPC3

Polipéptidos codificados por polinucleótidos insertados en vectores de expresión: GPC3 ERY8-2_Hk, GPC3 ERY7_L, ERY17-3_Hh (SEQ ID NO: 75; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una señal de secuencia), y ERY17-3_L (SEQ ID NO: 76; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal).

(2) Purificación de ERY 17-2 GPC3 y ERY 17-3 GPC3

El sobrenadante de cultivo resultante se cargó en una columna Anti FLAG M2 (Sigma). Después del lavado, la columna se eluyó con 0,1 mg/ml de péptido FLAG (Sigma). Una fracción que contenía la molécula diseñada se cargó en una columna HisTrap HP (GE Healthcare). Después del lavado, la columna se eluyó con un gradiente de concentración de imidazol. Una fracción que contenía la molécula diseñada se concentró por ultrafiltración. Luego, la fracción se cargó en una columna Superdex 200 (GE Healthcare). Solamente se recogió una fracción de monómero del eluato para obtener cada molécula diseñada purificada.

(3) Actividad citotóxica de ERY 17-2 GPC3 y ERY 17-3 GPC3

ERY 17-2 GPC3 y ERY 17-3 GPC3 se evaluaron para determinar su actividad citotóxica *in vitro* (Fig. 20). El resultado mostró que ambas moléculas exhibieron claramente una mayor actividad citotóxica que BiTE GPC3. Por lo tanto, la presente invención por primera vez demuestra que las moléculas en las que se utiliza una IgG antigénica anti-cancerígena como una cadena principal y uno de los Fab está sustituido con un dominio de unión a épsilon CD3 exhiben una actividad citotóxica comparable o mayor que la de BiTE.

(4) Ensayo de eficacia para ERY17-2 GPC3 utilizando el modelo de transferencia de células T PC-10

ERY17-2 GPC3, que demostró tener una actividad citotóxica comparable o superior a la de BiTE GPC3 en el ensayo *in vitro*, se evaluó la ineficacia *in vivo* utilizando el modelo de transferencia de células T PC-10. Específicamente, el ensayo de eficacia de ERY17-2 GPC3 utilizando el modelo de transferencia de células T PC-10 se llevó a cabo de la siguiente manera. El cultivo de expansión de células T se llevó a cabo utilizando un kit de activación/expansión de células T/humano (MACS Miltenyi biotec) y CMSP aisladas de sangre extraída de voluntarios sanos. Las células PC-10 de la estirpe celular de carcinoma escamoso de pulmón humano (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.) (1×10^7 células) se mezclaron con matriz de membrana Matrigel Basement (BD), y luego se transplantaron subcutáneamente a la región inguinal de ratones scid NOD (CLEA Japan Inc.; hembra, 7 semanas). El día del trasplante fue designado el día 0. El día antes del trasplante y los días 13, 17, 21 y 25, se administró a los ratones por vía intraperitoneal un anticuerpo anti-asialo-GM1 (Wako Pure Chemical Industries) a 0,2 mg/cabeza. El día 13 después del trasplante, los ratones se agruparon por el tamaño del tumor y el peso corporal. En el día 14 después del trasplante, las células T preparadas mediante cultivo de expansión como se ha descrito anteriormente se transplantaron a 3×10^7 células/cabeza a la cavidad peritoneal. Después de dos horas de trasplante, se administró ERY17-2 GPC por vía intravenosa a 30 μ g/cabeza. ERY17-2 GPC se administró cinco veces en total en los días 14, 15, 16, 17 y 18.

El resultado mostró que también se observó un claro efecto antitumoral en el grupo de administración ERY17-2 GPC3 de este modelo, en comparación con el grupo de administración de disolvente (Fig. 21).

El descubrimiento descrito anteriormente demuestra que las moléculas en las que se utiliza una IgG antigénica anti-cancerígena como cadena principal y uno de los Fab está sustituido con un dominio de unión a épsilon CD3 producen un claro efecto antitumoral *in vivo*.

[Ejemplo 8] Construcción y evaluación de ERY17-2-M20 GPC3

(1) Construcción de ERY17-2-M20 GPC3

A continuación, se construyó una molécula que conserva la actividad deseada incluso después de las alteraciones en el dominio de unión a épsilon de CD3. Se construyó ERY17-2-M20 GPC3 (Fig. 19A) en el que se alteró la secuencia del dominio de unión a épsilon de CD3. Específicamente, utilizando como plantilla un vector de expresión para un anticuerpo anti-CD3 (M20), se realizó un método conocido por un experto en la técnica, tal como PCR que utiliza cebadores que contienen las mismas secuencias apropiadas que en los métodos descritos anteriormente para producir una serie de vectores de expresión en los que se insertó un polinucleótido que codifica ERY17-2-M20_Hh (SEQ ID NO: 77; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal) o ERY17-2-M20_L (SEQ ID NO: 78; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales (que sirve como secuencia de señal).

(2) Purificación de ERY17-2-M20 GPC3

Los vectores de expresión para GPC3 ERY8-2_Hk, GPC3 ERY7_L, ERY17-2-M20_Hh (SEQ ID NO: 77) y ERY17-2-M20_L (SEQ ID NO: 78) se co-introdujeron en células FreeStyle293-F para expresar ERY17-2-M20 GPC3 de forma transitoria. El sobrenadante de cultivo resultante se filtró a través de un filtro de $\Phi 0,22 \mu$ m y luego se cargó en una columna de flujo rápido de proteína A r sefarsa equilibrada (GE Healthcare). El ERY17-2-M20 GPC3 purificado se obtuvo lavando las etapas 1 y 2, y la etapa de elución 1 utilizando los tampones que se muestran en la Tabla 3.

[Tabla 3]

EQUILIBRIO	Medio de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen), pen y estrep al 1 % (Invitrogen)
------------	---

LAVADO 1	Acetato de sodio 1 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5
LAVADO 2	HCl 0,3 mM, NaCl 150 mM, pH 3,7
ELUCIÓN 1	HCl 2 mM, pH2,7

(3) Actividad citotóxica de ERY17-2-M20 GPC3

5 ERY17-2-M20 GPC3 se analizó para determinar su actividad citotóxica *in vitro* y mostró una actividad citotóxica comparable a la de ERY17-2 GPC3 (Fig. 22). Este descubrimiento demuestra que incluso las moléculas que tienen una secuencia alterada en el dominio de unión a épsilon de CD3 tienen una actividad citotóxica comparable.

[Ejemplo 9] Construcción y evaluación de ERY17-2 EpCAM y ERY17-3 EpCAM

(1) Construcción de ERY17-2 EpCAM y ERY17-3 EpCAM

10 A continuación, se construyeron moléculas dirigidas a un antígeno canceroso diferente pero que retenían la actividad deseada. Se produjo ERY17-2 EpCAM (Fig. 19A), en el que el Fab anti-GPC3 en ERY17-2 GPC3 se reemplazó con un Fab anti-EpCAM, y ERY17-3 EpCAM (Fig. 19B), en el que el Fab anti-GPC3 en ERY17-3 GPC3 se reemplazó con un Fab anti-EpCAM. Específicamente, utilizando como plantilla un vector de expresión para un anticuerpo anti-EpCAM, se realizó un método conocido por los expertos en la técnica, como la PCR que utiliza cebadores que contienen las mismas secuencias apropiadas que en el método descrito anteriormente para producir una serie de vectores de expresión en los que se insertó un polinucleótido que codifica EpCAM ERY17_Hk (SEQ ID NO: 79; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal) o EpCAM ERY17_L (SEQ ID NO: 80; la secuencia madura no contenía los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal).

Las siguientes combinaciones de vectores de expresión se introdujeron en las células FreeStyle293-F para expresar cada molécula diseñada de forma transitoria.

20 R. Molécula diseñada: ERY17-2 EpCAM

Polipéptidos codificados por polinucleótidos insertados en vectores de expresión: EpCAM ERY17_Hk (SEQ ID NO: 79; la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), EpCAM ERY17_L (SEQ ID NO: 80; la secuencia no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), ERY17-2_Hh y ERY17-2_L

25 S. Molécula diseñada: ERY17-3 EpCAM

Polipéptidos codificados por polinucleótidos insertados en vectores de expresión: EpCAM ERY17_Hk, EpCAM ERY17_L, ERY17-3_Hh y ERY17-3_L

(2) Purificación de ERY17-2 EpCAM y ERY17-3 EpCAM

30 El sobrenadante de cultivo resultante se cargó en una columna Anti FLAG M2 (Sigma). Después del lavado, la columna se eluyó con 0,1 mg/ml de péptido FLAG (Sigma). Una fracción que contenía la molécula diseñada se cargó en una columna HisTrap HP (GE Healthcare). Después del lavado, la columna se eluyó con un gradiente de concentración de imidazol. Una fracción que contenía la molécula diseñada se concentró por ultrafiltración. Luego, la fracción se cargó en una columna Superdex 200 (GE Healthcare). Solamente se recogió una fracción de monómero del eluato para obtener cada molécula diseñada purificada.

35 (3) Actividad citotóxica de ERY17-2 EpCAM y ERY17-3 EpCAM

40 ERY17-2 EpCAM y ERY17-3 EpCAM se analizaron para determinar su actividad citotóxica *in vitro*, y ambos mostraron una fuerte actividad citotóxica (Fig. 23). Por lo tanto, la presente invención demuestra que las moléculas en las que se utiliza una IgG antigénica anti-cancerígena como una cadena principal y uno de los Fabs está sustituido con un dominio de unión a épsilon de CD3 tienen una actividad citotóxica incluso cuando se ha cambiado el tipo de antígeno canceroso.

[Ejemplo 10] Construcción y evaluación de anticuerpos biespecíficos con asociación interfacial CH1/CL modulada

(1) Diseño de anticuerpo biespecífico.

45 Al introducir mutaciones en cada uno de los dominios CH1 y CL de un anticuerpo biespecífico y, por lo tanto, modular la asociación interfacial CH1/CL con el uso de la repulsión de carga eléctrica en la interfaz CH1/CL, se puede permitir que ocurra una asociación específica entre la cadena P y la cadena L anti-GPC3 y entre la cadena P y la cadena L anti-CD3. Para modular la asociación interfacial CH1/CL utilizando repulsión de carga eléctrica, los residuos de aminoácidos en CH1 de las cadenas P o CL de las cadenas L fueron sustituidos con Lys, que está

cargada positivamente, o con Glu, que está cargada negativamente.

(2) Construcción de vectores de expresión para genes de anticuerpos y expresión de anticuerpos respectivos.

Un anticuerpo biespecífico (fig. 24A) se creó modulando la asociación interfacial CH1/CL del anticuerpo anti-CD3 M12 (cadena P, SEQ ID NO: 81; cadena L, SEQ ID NO: 82) y el anticuerpo anti-GPC3 GC33(2) (cadena P, SEQ ID NO: 83; cadena L, SEQ ID NO: 84) y la introducción adicional de modificaciones de botones en ojales (KiH) (documento WO 1996/027011; Ridgway JB *et al.* (*Protein Engineering* (1996) 9, 617-621), Merchant AM *et al.* (*Nat. Biotechnol.* (1998) 16, 677-681)) para evitar que las cadenas P se asocien entre sí. También se construyó un anticuerpo biespecífico de control (Fig. 24B), en el que no se introdujeron ni la modulación de la asociación interfacial CH1/CL ni las modificaciones de botones en ojales (KiH). Específicamente, los vectores de expresión que tienen como un inserto un polinucleótido que codifica M12_TH2h (SEQ ID NO: 85), en el que varios aminoácidos en CH1 de la cadena P de M12 (SEQ ID NO: 81) fueron sustituidos con Lys, o M12_TL17 (SEQ ID NO: 86), en la que varios aminoácidos en CL de la cadena L (SEQ ID NO: 82) se sustituyeron con Glu, se construyeron mediante un método conocido por los expertos en la técnica. Asimismo, los vectores de expresión que tienen como inserto un polinucleótido que codifica GC33(2)_TH13k (SEQ ID NO: 87) o GC33(2)_TH15k (SEQ ID NO: 88), en los cuales varios aminoácidos en CH1 de la cadena P de GC33(2) (SEQ ID NO: 83) se sustituyeron con Glu, o GC33(2)_TL16 (SEQ ID NO: 89) o GC33(2)_TL19 (SEQ ID NO: 90), en el cual varios aminoácidos en CL de la cadena L (SEQ ID NO: 84) se sustituyeron con Lys, se construyeron mediante un método conocido por los expertos en la técnica.

Las siguientes combinaciones de vectores de expresión se introdujeron en las células FreeStyle293-F para expresar cada molécula diseñada de forma transitoria.

20 T. Molécula diseñada: GM1

Vectores de expresión: M12_TH2h (SEQ ID NO: 85), M12_TL17 (SEQ ID NO: 86), GC33(2)_TH13k (SEQ ID NO: 87) y GC33(2)_TL16 (SEQ ID NO: 89)

U. Molécula diseñada: GM2

25 Vectores de expresión: M12_TH2h (SEQ ID NO: 85), M12_TL17 (SEQ ID NO: 86), GC33(2)_TH15k (SEQ ID NO: 88) y GC33(2)_TL19 (SEQ ID NO: 90)

V. Molécula diseñada: GM0

Vectores de expresión: cadena P de M12 (SEQ ID NO: 81), cadena L de M12 (SEQ ID NO: 82), cadena P de GC33(2) (SEQ ID NO: 83) y cadena L de GC33(2) (SEQ ID NO: 84).

30 Del sobrenadante de cultivo resultante, los anticuerpos se purificaron mediante un método conocido por los expertos en la técnica utilizando flujo rápido de proteína A r y sefarsa TM (GE Healthcare).

(3) Actividad citotóxica de GM1, GM2 y GM0

35 Los complejos polipeptídicos GM1, GM2 y GM0 se evaluaron para determinar su actividad citotóxica *in vitro*. El resultado mostró que GM1 y GM2 exhibieron una actividad citotóxica comparable, y esta actividad fue claramente mayor que la de GM0 (Fig. 25). Por lo tanto, la presente invención demuestra que la combinación de la modulación de la asociación interfacial CH1/CL y las modificaciones de KiH permiten una producción eficiente de anticuerpos biespecíficos.

[Ejemplo 11] Construcción y evaluación de ERY17-2 EGFR

(1) Construcción de ERY17-2 EGFR

40 Además, se preparó una molécula que tiene la actividad deseada que se dirige a otro antígeno cancerosa. Se construyó ERY17-2 EGFR (Fig. 19A) reemplazando el Fab anti-GPC3 de ERY17-2 GPC3 con el Fab anti-EGFR. Específicamente, utilizando como plantilla un vector de expresión para un anticuerpo anti-EGFR, se realizó un método conocido por los expertos en la técnica, como la PCR que utiliza cebadores que contienen las mismas secuencias apropiadas que en el método descrito anteriormente para producir una serie de vectores de expresión en los que se insertó el polinucleótido que codifica EGFR ERY17_Hk (SEQ ID NO: 91: la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal) o EGFR ERY17_L (SEQ ID NO: 92: la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal).

Las siguientes combinaciones de vectores de expresión se introdujeron en las células FreeStyle293-F para expresar cada molécula diseñada de forma transitoria.

W. Molécula diseñada: ERY17-2 EGFR

50 Polipéptidos codificados por polinucleótidos insertados en vectores de expresión: EGFR ERY17_Hk (SEQ ID NO: 91: la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal),

EGFR ERY17_L (SEQ ID NO: 92: la secuencia madura no contiene los 19 aminoácidos amino terminales, que sirve como una secuencia de señal), ERY17-2_Hh y ERY17-2_L.

(2) Purificación de ERY17-2 EGFR

5 Los sobrenadantes de cultivo resultantes se cargaron en una columna Anti FLAG M2 (Sigma). Después del lavado, la columna se eluyó con 0,1 mg/ml de péptido FLAG (Sigma). Una fracción que contenía la molécula diseñada se cargó en una columna HisTrap HP (GE Healthcare). Después del lavado, la columna se eluyó con un gradiente de concentración de imidazol. Una fracción que contenía la molécula diseñada se concentró por ultrafiltración. Luego, la fracción se cargó en una columna Superdex 200 (GE Healthcare). Solamente se recogió una fracción de monómero del eluato para obtener cada molécula diseñada purificada.

10 (3) Actividad citotóxica de ERY17-2 EGFR

ERY17-2 EGFR se sometió a ensayo para la actividad citotóxica *in vitro*, y mostró una fuerte actividad citotóxica (Fig. 26). De este modo, la presente invención demuestra que las moléculas en las que se utiliza una IgG antigénica anti-cancerígena como cadena principal y uno de los Fabs está sustituido con un dominio de unión a epsilon de CD3 tienen una actividad citotóxica incluso cuando el antígeno canceroso es GPC3 o EpCAM o el tipo de antígeno canceroso se ha cambiado aún más.

Aplicabilidad industrial

20 La presente invención proporciona nuevos complejos polipeptídicos que retienen la fuerte actividad antitumoral de BiTE y tienen una larga semivida en sangre, así como excelentes propiedades de seguridad que no provocan la inducción de una tormenta de citoquinas independiente del antígeno canceroso o similares. Cuando se sustituye el dominio de unión a antígeno de un complejo polipeptídico de la presente invención, los agentes terapéuticos que comprenden el complejo polipeptídico como ingrediente activo para inducir la citotoxicidad celular, pueden atacar y dañar varias células, incluidas las células cancerosas. Por consiguiente, varios cánceres pueden ser tratados o prevenidos. Esto permite tratamientos deseables que son altamente seguros y convenientes, y reduce la carga física de los pacientes.

25

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA						
	<120> AGENTE TERAPÉUTICO QUE INDUCE CITOTOXICIDAD						
5	<130> C1-A1010Y2P						
	<150> JP 2010-266760						
	<151> 30-11-2010						
10	<150> JP 2011-121771						
	<151> 31-05-2011						
	<150> JP 2011-238818						
15	<151> 31-10-2011						
	<160> 92						
	<170> PatentIn versión 3.5						
20	<210> 1						
	<211> 1812						
	<212> ADN						
	<213> Homo sapiens						
25	<400> 1						
	atggccggga	ccgtgcgcac	cgcggtgcttg	gtggtggcga	tgctgctcag	cttggacttc	60
	ccgggacagg	cgcagcccc	gccgccgccc	ccggacgcca	cctgtcacca	agtccgctcc	120
	ttcttccaga	gactgcagcc	cgactcaag	tggtgccag	aaactcccgt	gccaggatca	180
	gatttgcaag	tatgtctccc	taagggcca	acatgctgct	caagaaagat	ggaagaaaa	240
	taccaactaa	cagcacgatt	gaacatggaa	cagctgcttc	agtctgcaag	tatggagctc	300
	aagttcttaa	ttattcagaa	tgctgcggtt	ttccaagagg	cctttgaaat	tgttgttcgc	360
	catgccaaga	actacaccaa	tgccatgttc	aagaacaact	accaagcct	gactccacaa	420
	gcttttgagt	ttgtgggtga	atthttcaca	gatgtgtctc	tctacatctt	gggttctgac	480
	atcaatgtag	atgacatggt	caatgaattg	ttgacagcc	tgthttccagt	catctatacc	540
	cagctaataga	accaggcct	gcctgattca	gccttgaca	tcaatgagtg	cctccgagga	600
	gcaagacgtg	acctgaaagt	atthgggaat	ttccccaa	gtattatgac	ccaggtttcc	660
	aagtcactgc	aagtcactag	gatcttcctt	caggetctga	atcttggaat	tgaagtgatc	720
	aacacaactg	atcacctgaa	gttcagtaag	gactgtggcc	gaatgctcac	cagaatgtgg	780
	tactgctctt	actgccaggg	actgatgatg	gttaaaccct	gtggcggtta	ctgcaatgtg	840
	gtcatgcaag	gctgtatggc	aggtgtggtg	gagattgaca	agtactggag	agaatacatt	900
	ctgtcccttg	aagaacttgt	gaatggcatg	tacagaatct	atgacatgga	gaacgtactg	960
	cttggctctt	tttcaacaat	ccatgattct	atccagtatg	tccagaagaa	tgcaaggaa	1020
	ctgaccacca	ctgaaactga	gaagaaaata	tgccacttca	aatatcctat	cttcttctg	1080

ES 2 693 232 T3

tgtatagggc tagacttaca gattggcaag ttatgtgcc attctcaaca acgccaatat 1140
 agatctgctt attatcctga agatctcttt attgacaaga aagtattaaa agttgctcat 1200
 gtagaacatg aagaaacctt atccagccga agaagggaac taattcagaa gttgaagtct 1260
 ttcacacgct tctatagtgc tttgcctggc tacatctgca gccatagccc tgtggcggaa 1320
 aacgacaccc tttgctggaa tggacaagaa ctctgtggaga gatacagcca aaaggcagca 1380
 aggaatggaa tgaaaaacca gttcaatctc catgagctga aatgaaggg ccctgagcca 1440
 gtggtcagtc aaattattga caaactgaag cacattaacc agctcctgag aaccatgtct 1500
 atgcccaaag gtagagttct ggataaaaac ctggatgagg aagggtttga aagtggagac 1560
 tgcggtgatg atgaagatga gtgcattgga ggctctggtg atggaatgat aaaagtgaag 1620
 aatcagctcc gcttccttgc agaactggcc tatgatctgg atgtggatga tgcgcctgga 1680
 aacagtcagc aggcaactcc gaaggacaac gagataagca cctttcacia cctcgggaac 1740
 gttcattccc cgctgaagct tctcaccagc atggccatct cggtggtgtg cttcttcttc 1800
 ctggtgcact ga 1812

<210> 2
 <211> 603
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2
 Met Ala Gly Thr Val Arg Thr Ala Cys Leu Val Val Ala Met Leu Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Asp Phe Pro Gly Gln Ala Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp
 20 25 30
 Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly
 35 40 45
 Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val
 50 55 60
 Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys
 65 70 75 80
 Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala
 85 90 95
 Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln
 100 105 110
 Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala

10

ES 2 693 232 T3

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

ES 2 693 232 T3

Gly Lys Leu Cys Ala His Ser Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala Tyr
 370 375 380

Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala His
 385 390 395 400

Val Glu His Glu Glu Thr Leu Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile Gln
 405 410 415

Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Ile
 420 425 430

Cys Ser His Ser Pro Val Ala Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn Gly
 435 440 445

Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly Met
 450 455 460

Lys Asn Gln Phe Asn Leu His Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu Pro
 465 470 475 480

Val Val Ser Gln Ile Ile Asp Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu Leu
 485 490 495

Arg Thr Met Ser Met Pro Lys Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu Asp
 500 505 510

Glu Glu Gly Phe Glu Ser Gly Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu Cys
 515 520 525

Ile Gly Gly Ser Gly Asp Gly Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu Arg
 530 535 540

Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro Gly
 545 550 555 560

Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His
 565 570 575

Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys Leu Leu Thr Ser Met Ala
 580 585 590

Ile Ser Val Val Cys Phe Phe Phe Leu Val His
 595 600

<210> 3
 <211> 945
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

ES 2 693 232 T3

atggcgcccc cgcaggtcct cgcgttcggg cttctgcttg ccgcggcgac ggcgactttt 60
gccgcagctc aggaagaatg tgtctgtgaa aactacaagc tggccgtaaa ctgctttgtg 120
aataataatc gtcaatgccca gtgtacttca gttggtgcac aaaatactgt catttgctca 180
aagctggctg ccaaagtgtt ggtgatgaag gcagaaatga atggctcaaa acttgggaga 240
agagcaaaac ctgaaggggc cctccagaac aatgatgggc tttatgatcc tgactgcgat 300
gagagcgggc tctttaaggc caagcagtgc aacggcacct ccatgtgctg gtgtgtgaac 360
actgctgggg tcagaagaac agacaaggac actgaaataa cctgctctga gcgagtgaga 420
acctactgga tcatcattga actaaaacac aaagcaagag aaaaacctta tgatagtaaa 480
agtttgcgga ctgcacttca gaaggagatc acaacgcggt atcaactgga tccaaaattt 540
atcacgagta ttttgtatga gaataatggt atcactattg atctggttca aaattcttct 600
caaaaaactc agaatgatgt ggacatagct gatgtggctt attattttga aaaagatggt 660
aaagtgtaat ccttgtttca ttctaagaaa atggacctga cagtaaattg ggaacaactg 720
gatctggatc ctgggtcaaac ttttaatttat tatgttgatg aaaaagcacc tgaattctca 780
atgcagggtc taaaagctgg tgttattgct gttattgtgg ttgtggtgat agcagttggt 840
gctggaattg ttgtgctggt tatttccaga aagaagagaa tggcaaagta tgagaaggct 900
gagataaagg agatgggtga gatgcatagg gaactcaatg cataa 945

<210> 4
<211> 314
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Met Ala Pro Pro Gln Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Leu Ala Ala Ala
1 5 10 15

Thr Ala Thr Phe Ala Ala Ala Gln Glu Glu Cys Val Cys Glu Asn Tyr
20 25 30

Lys Leu Ala Val Asn Cys Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln Cys
35 40 45

Thr Ser Val Gly Ala Gln Asn Thr Val Ile Cys Ser Lys Leu Ala Ala
50 55 60

Lys Cys Leu Val Met Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly Arg
65 70 75 80

10

ES 2 693 232 T3

Arg Ala Lys Pro Glu Gly Ala Leu Gln Asn Asn Asp Gly Leu Tyr Asp
85 90 95

Pro Asp Cys Asp Glu Ser Gly Leu Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn Gly
100 105 110

Thr Ser Met Cys Trp Cys Val Asn Thr Ala Gly Val Arg Arg Thr Asp
115 120 125

Lys Asp Thr Glu Ile Thr Cys Ser Glu Arg Val Arg Thr Tyr Trp Ile
130 135 140

Ile Ile Glu Leu Lys His Lys Ala Arg Glu Lys Pro Tyr Asp Ser Lys
145 150 155 160

Ser Leu Arg Thr Ala Leu Gln Lys Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Gln Leu
165 170 175

Asp Pro Lys Phe Ile Thr Ser Ile Leu Tyr Glu Asn Asn Val Ile Thr
180 185 190

Ile Asp Leu Val Gln Asn Ser Ser Gln Lys Thr Gln Asn Asp Val Asp
195 200 205

Ile Ala Asp Val Ala Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp Val Lys Gly Glu Ser
210 215 220

Leu Phe His Ser Lys Lys Met Asp Leu Thr Val Asn Gly Glu Gln Leu
225 230 235 240

Asp Leu Asp Pro Gly Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys Ala
245 250 255

Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys Ala Gly Val Ile Ala Val Ile
260 265 270

Val Val Val Val Ile Ala Val Val Ala Gly Ile Val Val Leu Val Ile
275 280 285

Ser Arg Lys Lys Arg Met Ala Lys Tyr Glu Lys Ala Glu Ile Lys Glu
290 295 300

Met Gly Glu Met His Arg Glu Leu Asn Ala
305 310

<210> 5
<211> 4
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 5

Gly Gly Gly Ser
 1
 <210> 6
 <211> 4
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente
 10
 <400> 6
 Ser Gly Gly Gly
 1
 15 <210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente
 <400> 7
 Gly Gly Gly Gly Ser
 25 1 5
 <210> 8
 <211> 5
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente
 35 <400> 8
 Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5
 <210> 9
 <211> 6
 40 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente
 45 <400> 9
 Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 10
 <211> 6
 50 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente
 55 <400> 10
 Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5
 60 <210> 11

ES 2 693 232 T3

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 11
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

10 <210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 12
 Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5

20 <210> 13
 <211> 1125
 <212> ADN
 25 <213> Homo sapiens

<400> 13
 atgtggttct tgacaactct gtccttttgg gttccagttg atgggcaagt ggacaccaca 60
 aaggcagtga tcacttttga gcctccatgg gtcagcgtgt tccaagagga aaccgtaacc 120
 ttgcactgtg aggtgctcca tctgcctggg agcagctcta cacagtgggt tctcaatggc 180
 acagccactc agacctcgac ccccagctac agaatcacct ctgccagtgt caatgacagt 240
 ggtgaataca ggtgccagag aggtctctca gggcgaagtg accccataca gctggaaatc 300
 cacagaggct ggctactact gcaggtctcc agcagagtct tcacggaagg agaacctctg 360

gccttgaggt gtcatgctg gaaggataag ctggtgtaca atgtgcttta ctatcgaaat 420
 ggcaaagcct ttaagttttt cactggaat tctaacctca ccattctgaa aaccaacata 480
 agtcacaatg gcaacctacca ttgctcaggc atgggaaagc atcgctacac atcagcagga 540
 atatctgtca ctgtgaaaga gctatttcca gctccagtgc tgaatgcatc tgtgacatcc 600
 ccactcctgg aggggaatct ggtcaccctg agctgtgaaa caaagttgct cttgcagagg 660
 cctggtttgc agctttactt ctccctctac atgggcagca agaccctgag aggcaggaac 720
 acatcctctg aataccaaat actaactgct agaagagaag actctggggt atactggtgc 780
 gaggtgccca cagaggatgg aatgtcctt aagcgcagcc ctgagttgga gcttcaagtg 840
 cttggcctcc agttaccaac tcctgtctgg tttcatgtcc ttttctatct ggcagtggga 900
 ataatgtttt tagtgaacac tgttctctgg gtgacaatac gtaaagaact gaaaagaaag 960
 aaaaagtggg atttagaaat ctctttggat tctgggtcatg agaagaaggt aatttccagc 1020
 cttcaagaag acagacattt agaagaagag ctgaaatgtc aggaacaaaa agaagaacag 1080
 30 ctgcaggaag ggggtgcaccg gaaggagccc cagggggcca cgtag 1125

ES 2 693 232 T3

<210> 14
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 14
 Met Trp Phe Leu Thr Thr Leu Leu Leu Trp Val Pro Val Asp Gly Gln
 1 5 10 15
 Val Asp Thr Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser
 20 25 30
 Val Phe Gln Glu Glu Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val Leu His Leu
 35 40 45
 Pro Gly Ser Ser Ser Thr Gln Trp Phe Leu Asn Gly Thr Ala Thr Gln
 50 55 60
 Thr Ser Thr Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Ser Ala Ser Val Asn Asp Ser
 65 70 75 80
 Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Arg Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Pro Ile
 85 90 95
 Gln Leu Glu Ile His Arg Gly Trp Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Arg
 100 105 110

ES 2 693 232 T3

Val Phe Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Ala Trp Lys
 115 120 125

Asp Lys Leu Val Tyr Asn Val Leu Tyr Tyr Arg Asn Gly Lys Ala Phe
 130 135 140

Lys Phe Phe His Trp Asn Ser Asn Leu Thr Ile Leu Lys Thr Asn Ile
 145 150 155 160

Ser His Asn Gly Thr Tyr His Cys Ser Gly Met Gly Lys His Arg Tyr
 165 170 175

Thr Ser Ala Gly Ile Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Phe Pro Ala Pro
 180 185 190

Val Leu Asn Ala Ser Val Thr Ser Pro Leu Leu Glu Gly Asn Leu Val
 195 200 205

Thr Leu Ser Cys Glu Thr Lys Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln
 210 215 220

Leu Tyr Phe Ser Phe Tyr Met Gly Ser Lys Thr Leu Arg Gly Arg Asn
 225 230 235 240

Thr Ser Ser Glu Tyr Gln Ile Leu Thr Ala Arg Arg Glu Asp Ser Gly
 245 250 255

Leu Tyr Trp Cys Glu Ala Ala Thr Glu Asp Gly Asn Val Leu Lys Arg
 260 265 270

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

Val Trp Phe His Val Leu Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu
 290 295 300

Val Asn Thr Val Leu Trp Val Thr Ile Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys
 305 310 315 320

Lys Lys Trp Asp Leu Glu Ile Ser Leu Asp Ser Gly His Glu Lys Lys
 325 330 335

Val Ile Ser Ser Leu Gln Glu Asp Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 340 345 350

Cys Gln Glu Gln Lys Glu Glu Gln Leu Gln Glu Gly Val His Arg Lys
 355 360 365

Glu Pro Gln Gly Ala Thr
 370

5 <210> 15
 <211> 951
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 15

ES 2 693 232 T3

atgactatgg agacccaaat gtctcagaat gtatgtccca gaaacctgtg gctgcttcaa 60
 ccattgacag ttttgctgct gctggcttct gcagacagtc aagctgctcc cccaaaggct 120
 gtgctgaaac ttgagccccc gtggatcaac gtgctccagg aggactctgt gactctgaca 180
 tgccaggggg ctcgcagccc tgagagcgac tccattcagt ggttcacaaa tgggaatctc 240
 attcccaccc acacgcagcc cagctacagg ttcaaggcca acaacaatga cagcggggag 300
 tacacgtgcc agactggcca gaccagcctc agcagacctg tgcattctgac tgtgctttcc 360
 gaatggctgg tgctccagac ccctcacctg gagttccagg agggagaaac catcatgctg 420
 aggtgccaca gctggaagga caagcctctg gtcaagggtca cattcttcca gaatggaaaa 480
 tcccagaaat tctcccattt ggatcccacc ttctccatcc cacaagcaa cccagctcac 540
 agtggtgatt accactgcac aggaacata ggctacacgc tgttctcatc caagcctgtg 600
 accatcactg tccaagtgcc cagcatgggc agctcttcac caatgggggt cattgtggct 660
 gtggtcattg cgactgctgt agcagccatt gttgctgctg tagtggcctt gatctactgc 720
 aggaaaaagc ggatttcagc caattccact gatcctgtga aggctgcca atttgagcca 780
 cctggacgtc aatgattgc catcagaaag agacaacttg aagaaaccaa caatgactat 840
 gaaacagctg acggcggcta catgactctg aaccccaggg cacctactga cgatgataaa 900
 aacatctacc tgactcttcc tcccaacgac catgtcaaca gtaataacta a 951

<210> 16

<211> 316

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Thr Met Glu Thr Gln Met Ser Gln Asn Val Cys Pro Arg Asn Leu
 1 5 10 15

Trp Leu Leu Gln Pro Leu Thr Val Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ala Asp
 20 25 30

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

10

ES 2 693 232 T3

Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Gln Gly Ala
50 55 60

Arg Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu
65 70 75 80

Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn
85 90 95

Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp
100 105 110

Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro
115 120 125

His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Met Leu Arg Cys His Ser
130 135 140

Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys
145 150 155 160

Ser Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr Phe Ser Ile Pro Gln Ala
165 170 175

Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr
180 185 190

Thr Leu Phe Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Val Pro Ser
195 200 205

Met Gly Ser Ser Ser Pro Met Gly Val Ile Val Ala Val Val Ile Ala
210 215 220

Thr Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys
225 230 235 240

Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Ser Thr Asp Pro Val Lys Ala Ala
245 250 255

Gln Phe Glu Pro Pro Gly Arg Gln Met Ile Ala Ile Arg Lys Arg Gln
260 265 270

Leu Glu Glu Thr Asn Asn Asp Tyr Glu Thr Ala Asp Gly Gly Tyr Met
275 280 285

Thr Leu Asn Pro Arg Ala Pro Thr Asp Asp Asp Lys Asn Ile Tyr Leu
290 295 300

Thr Leu Pro Pro Asn Asp His Val Asn Ser Asn Asn
305 310 315

5 <210> 17
<211> 876
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <400> 17

ES 2 693 232 T3

atgggaatcc tgtcattctt acctgtcctt gccactgaga gtgactgggc tgactgcaag 60
 tccccccagc cttgggggtca tatgcttctg tggacagctg tgctattcct ggctcctggt 120
 gctgggacac ctgcagctcc cccaaaggct gtgctgaaac tcgagcccca gtggatcaac 180
 gtgctccagg aggactctgt gactctgaca tgccggggga ctcacagccc tgagagcgac 240
 tccattcagt ggttccacaa tgggaatctc attcccaccc acacgcagcc cagctacagg 300
 ttcaaggcca acaacaatga cagcggggag tacacgtgcc agactggcca gaccagcctc 360
 agcgaccctg tgcattctgac tgtgctttct gagggtgctg tgctccagac ccctcacctg 420
 gagttccagg agggagaaaac catcgtgctg aggtgccaca gctggaagga caagcctctg 480
 gtcaagggtca cattcttcca gaatggaaa tccaagaaat tttcccgttc ggatcccaac 540
 ttctccatcc cacaagcaaa ccacagtcac agtgggtgatt accactgcac aggaacata 600
 ggctacacgc tgtactcatc caagcctgtg accatcactg tccaagctcc cagctcttca 660
 ccgatgggga tcattgtggc tgtggtcact gggattgctg tagcggccat tgttgctgct 720
 gtagtggcct tgatctactg caggaaaaag cggatttcag ccaatccac taatcctgat 780
 gaggtgaca aagttggggc tgagaacaca atcacctatt cacttctcat gcaccoggat 840
 gctctggaag agcctgatga ccagaaccgt atttag 876

<210> 18
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 18
 Met Gly Ile Leu Ser Phe Leu Pro Val Leu Ala Thr Glu Ser Asp Trp
 1 5 10 15
 Ala Asp Cys Lys Ser Pro Gln Pro Trp Gly His Met Leu Leu Trp Thr
 20 25 30
 Ala Val Leu Phe Leu Ala Pro Val Ala Gly Thr Pro Ala Ala Pro Pro
 35 40 45
 Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu
 50 55 60

10

ES 2 693 232 T3

Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp
65 70 75 80

Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln
85 90 95

Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr
100 105 110

Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val
115 120 125

Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu
130 135 140

Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu
145 150 155 160

Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg
165 170 175

Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly
180 185 190

Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys
195 200 205

Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile
210 215 220

Ile Val Ala Val Val Thr Gly Ile Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala
225 230 235 240

Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Pro
245 250 255

Thr Asn Pro Asp Glu Ala Asp Lys Val Gly Ala Glu Asn Thr Ile Thr
260 265 270

Tyr Ser Leu Leu Met His Pro Asp Ala Leu Glu Glu Pro Asp Asp Gln
275 280 285

Asn Arg Ile
290

<210> 19

<211> 765

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 19

ES 2 693 232 T3

atgtggcagc tgctcctccc aactgctctg ctacttctag tttcagctgg catgctggact 60
 gaagatctcc caaaggctgt ggtgttcctg gagcctcaat ggtacagggg gctcgagaag 120
 gacagtgtga ctctgaagtg ccaggagacc tactcccctg aggacaattc cacacagtgg 180
 tttcacaatg agagcctcat ctcaagccag gcctcgagct acttcattga cgctgccaca 240
 gttgacgaca gtggagagta caggtgccag acaaacctct ccaccctcag tgaccctggg 300
 cagctagaag tccatatacg ctggctgttg ctccaggccc ctcggtgggt gttcaaggag 360
 gaagacccta ttcacctgag gtgtcacagc tggagaaca ctgctctgca taaggtcaca 420
 tatttacaga atggcaaagg caggaagtat tttcatcata attctgactt ctacattcca 480
 aaagccacac tcaagacag cggctcctac ttctgcaggg ggcttgttgg gagtaaaaat 540
 gtgtcttcag agactgtgaa catcaccatc actcaagggt tgtcagtgtc aaccatctca 600
 tcattctttc cacctgggta ccaagtctct ttctgcttgg tgatgttact cctttttgca 660
 gtggacacag gactatattt ctctgtgaag acaaacattc gaagctcaac aagagactgg 720
 aaggaccata aatttaaag gagaaaggac cctcaagaca aatga 765

<210> 20
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

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

10

ES 2 693 232 T3

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
 100 105 110

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
 115 120 125

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
 130 135 140

Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
 145 150 155 160

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
 165 170 175

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
 180 185 190

Gly Leu Ser Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
 195 200 205

Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
 210 215 220

Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp
 225 230 235 240

Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys
 245 250

<210> 21
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 21
 atgtggcagc tgctcctccc aactgctctg ctacttctag tttcagctgg catgctggact 60
 gaagatctcc caaaggctgt ggtgttcctg gaggctcaat ggtacagcgt gcttgagaag 120
 gacagtgtga ctctgaagtg ccagggagcc tactcccctg aggacaattc cacacagtgg 180
 tttcacaatg agagcctcat ctcaagccag gcctcgagct acttcattga cgctgccaca 240
 gtcaacgaca gtggagagta caggtgccag acaaacctct ccaccctcag tgaccgggtg 300
 cagctagaag tccatatacg ctggctgttg ctccaggccc ctcgggtgggt gttcaaggag 360
 gaagacccta ttcacctgag gtgtcacagc tggaagaaca ctgctctgca taaggtcaca 420
 tatttacaga atggcaaaga caggaagtat tttcatcata attctgactt ccacattcca 480
 aaagccacac tcaaagatag cggctcctac ttctgcaggg ggcttgttgg gagtaaaaat 540
 gtgtcttcag agactgtgaa catcaccatc actcaagggt tggcagtgtc aaccatctca 600
 tcattctctc cacctgggta ccaagtctct ttctgcttgg tgatgtact cctttttgca 660
 gtggacacag gactatattt ctctgtgaag acaaacattt ga 702

10

<210> 22

ES 2 693 232 T3

<211> 233
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 22
 Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
 1 5 10 15
 Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
 20 25 30
 Gln Trp Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
 35 40 45
 Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
 50 55 60
 Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
 65 70 75 80
 Val Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
 85 90 95
 Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
 100 105 110
 Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
 115 120 125
 His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
 130 135 140
 Gly Lys Asp Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe His Ile Pro
 145 150 155 160
 Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Val
 165 170 175
 Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
 180 185 190
 Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Ser Pro Pro Gly Tyr Gln
 195 200 205
 Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
 210 215 220
 Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile
 225 230

10 <210> 23
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

ES 2 693 232 T3

<400> 23

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

ES 2 693 232 T3

165 170 175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 24
<211> 326
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada artificialmente

10 <400> 24
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

ES 2 693 232 T3

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

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

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

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

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

ES 2 693 232 T3

<210> 25
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

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

10

ES 2 693 232 T3

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 26
<211> 327
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada artificialmente

10 <400> 26

ES 2 693 232 T3

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

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 693 232 T3

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 27
 <211> 549
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 atggaacagg ggaagggcct ggctgtcctc atcctggcta tcattcttct tcaaggtact 60
 ttggcccagt caatcaaagg aaaccacttg gttaaggtgt atgactatca agaagatgg 120
 tcggtacttc tgacttgtga tgcagaagcc aaaaatatca catggtttaa agatgggaag 180
 atgatcggtc tcctaactga agataaaaaa aaatggaatc tggaagtaa tgccaaggac 240
 cctcgagggg tgtatcagt taaaggatca cagaacaagt caaaaccact ccaagtgtat 300
 tacagaatgt gtcagaactg cattgaacta aatgcagcca ccatatctgg ctttctcttt 360
 gctgaaatcg tcagcatttt cgtccttgct gttgggtct acttcattgc tggacaggat 420
 ggagttcgcc agtcgagagc ttcagacaag cagactctgt tgcccaatga ccagctctac 480
 cagccctca aggatcgaga agatgaccag tacagccacc ttcaaggaaa ccagttgagg 540
 aggaattga 549

10 <210> 28
 <211> 182
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 28
 Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu
 1 5 10 15

Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys
 20 25 30

ES 2 693 232 T3

Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala
 35 40 45

Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe
 50 55 60

Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp
 65 70 75 80

Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro
 85 90 95

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala
 100 105 110

Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val
 115 120 125

Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln
 130 135 140

Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr
 145 150 155 160

Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly
 165 170 175

Asn Gln Leu Arg Arg Asn
 180

<210> 29
 <211> 516
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 29
 atggaacata gcacgtttct ctctggcctg gtactggcta cccttctctc gcaagtgagc 60
 cccttcaaga tacctataga ggaacttgag gacagagtgt ttgtgaattg caataccagc 120
 atcacatggg tagaggggaac ggtgggaaca ctgctctcag acattacaag actggacctg 180
 ggaaaacgca tcctggacc cagaggaata tatagggtgta atgggacaga tatatacaag 240
 gacaaagaat ctaccgtgca agttcattat cgaatgtgcc agagctgtgt ggagctggat 300
 ccagccaccg tggctggcat cattgtcact gatgtcattg ccactctgct ccttgctttg 360
 ggagtcttct gctttgctgg acatgagact ggaaggctgt ctggggctgc cgacacacaa 420
 gctctgttga ggaatgacca ggtctatcag cccctccgag atcgagatga tgctcagtac 480
 agccaccttg gaggaactg ggctcggaac aagtga 516

10

<210> 30
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

ES 2 693 232 T3

<400> 30

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
1 5 10 15

Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
20 25 30

Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
35 40 45

Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile
50 55 60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys
85 90 95

Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val
100 105 110

Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His
115 120 125

Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg
130 135 140

Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Ala Gln Tyr
145 150 155 160

Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys
165 170

<210> 31

5 <211> 624

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 31

atgcagtcgg gcaactcactg gagagttctg ggcctctgcc ttttatcagt tggcgtttgg 60

10 gggcaagatg gtaatgaaga aatgggtggt attacacaga caccatataa agtctccatc 120

ES 2 693 232 T3

tctggaacca cagtaatatt gacatgccct cagtatcctg gatctgaaat actatggcaa 180
 cacaatgata aaaacatagg cgggtgatgag gatgataaaa acataggcag tgatgaggat 240
 cacctgtcac tgaaggaatt ttcagaattg gagcaaagtg gttattatgt ctgctacccc 300
 agaggaagca aaccagaaga tgcgaacttt tatctctacc tgagggcaag agtgtgtgag 360
 aactgcatgg agatggatgt gatgtcggtg gccacaattg tcatagtgga catctgcatc 420
 actgggggct tgctgctgct ggtttactac tggagcaaga atagaaaggc caaggccaag 480
 cctgtgacac gaggagcggg tgctggcggc aggcaaaggg gacaaaacaa ggagaggcca 540
 ccacctgttc ccaaccaga ctatgagccc atccggaaag gccagcggga cctgtattct 600
 ggctgaatc agagacgcat ctga 624

<210> 32
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 32
 Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
 20 25 30
 Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
 35 40 45
 Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
 50 55 60
 Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
 65 70 75 80
 His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
 85 90 95
 Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
 100 105 110
 Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
 115 120 125
 Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
 130 135 140

10

ES 2 693 232 T3

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195 200 205

<210> 33
<211> 523
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 33
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

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

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu

ES 2 693 232 T3

```

145                                150                                155                                160

Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
           165                                170                                175

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

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
           195                                200                                205

Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
           210                                215                                220

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

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

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln
           260                                265

Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys
           275                                280                                285

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val
290                                295                                300

Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn
305                                310                                315                                320

Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly
           325                                330                                335

Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala
           340                                345                                350

Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly
           355                                360                                365

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
370                                375                                380

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
385                                390                                395                                400

```

ES 2 693 232 T3

Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 405 410 415

Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 420 425 430

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
 435 440 445

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 450 455 460

Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr
 465 470 475 480

Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
 485 490 495

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 500 505 510

Val Ser Ala His His His His His His His His
 515 520

<210> 34
 <211> 753
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

10 <400> 34
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

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

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser

ES 2 693 232 T3

				85					90					95			
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val		
			100					105					110				
Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Phe	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr		
		115					120					125					
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser		
	130					135					140						
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu		
145					150					155					160		
Pro	Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln		
				165					170					175			
Ser	Leu	Val	His	Ser	Asn	Arg	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln		
			180					185					190				
Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg		
		195					200					205					
Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp		
	210					215					220						
Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr		
225					230					235					240		
Tyr	Cys	Ser	Gln	Asn	Thr	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr		
				245					250					255			
Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln		
			260					265					270				
Glu	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Ser	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys		
		275					280					285					
Arg	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val		
	290					295					300						
Gln	Glu	Lys	Pro	Asp	His	Leu	Phe	Thr	Gly	Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn		
305					310					315					320		
Lys	Arg	Ala	Pro	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Leu	Ile	Gly		
				325					330					335			

ES 2 693 232 T3

Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala
 340 345 350

Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly
 355 360 365

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 370 375 380

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
 385 390 395 400

Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 405 410 415

Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 420 425 430

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
 435 440 445

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 450 455 460

Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr
 465 470 475 480

Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
 485 490 495

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 500 505 510

Val Ser Ala Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 515 520 525

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 530 535 540

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 545 550 555 560

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 565 570 575

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 580 585 590

ES 2 693 232 T3

Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
595 600 605

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
610 615 620

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
625 630 635 640

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
645 650 655

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
660 665 670

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
675 680 685

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
690 695 700

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
705 710 715 720

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
725 730 735

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro His His His His His His His
740 745 750

His

<210> 35

<211> 257

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

10

<400> 35

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
20 25 30

ES 2 693 232 T3

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 35 40 45

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 50 55 60

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 65 70 75 80

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 85 90 95

Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 100 105 110

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 115 120 125

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 130 135 140

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys
 145 150 155 160

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
 165 170 175

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 180 185 190

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 195 200 205

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 210 215 220

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 225 230 235 240

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
 245 250 255

Lys

<210> 36
 <211> 514
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

10

<400> 36

ES 2 693 232 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

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

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
 145 150 155 160

Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
 165 170 175

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

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
 195 200 205

Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 210 215 220

ES 2 693 232 T3

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Cys Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 245 250 255
 Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 260 265 270
 Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 275 280 285
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 290 295 300
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 305 310 315 320
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 325 330 335
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 340 345 350
 Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 355 360 365
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 370 375 380
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 385 390 395 400
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 405 410 415
 Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly
 420 425 430
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 435 440 445
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 450 455 460
 Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 465 470 475 480
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 485 490 495
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
 500 505 510
 Asp Lys

ES 2 693 232 T3

<210> 37
 <211> 629
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

10 <400> 37
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125
 Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
 145 150 155 160

ES 2 693 232 T3

Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
165 170 175

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

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
195 200 205

Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
210 215 220

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

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

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu
260 265 270

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

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg
290 295 300

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys
305 310 315 320

Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe
325 330 335

Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn
340 345 350

Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly
355 360 365

Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
370 375 380

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
385 390 395 400

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
405 410 415

ES 2 693 232 T3

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
420 425 430

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
435 440 445

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
450 455 460

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
465 470 475 480

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
485 490 495

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
500 505 510

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
515 520 525

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
530 535 540

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
545 550 555 560

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
565 570 575

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
580 585 590

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
595 600 605

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro His His His
610 615 620

His His His His His
625

<210> 38

<211> 613

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

10

<400> 38

ES 2 693 232 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

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

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
 145 150 155 160

Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
 165 170 175

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

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
 195 200 205

Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 210 215 220

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

ES 2 693 232 T3

Tyr Cys Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 245 250 255
 Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln
 260 265 270
 Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys
 275 280 285
 Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val
 290 295 300
 Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn
 305 310 315 320
 Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly
 325 330 335
 Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala
 340 345 350
 Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly
 355 360 365
 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 370 375 380
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 385 390 395 400
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 405 410 415
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 420 425 430
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 435 440 445
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 450 455 460
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 465 470 475 480
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 485 490 495

ES 2 693 232 T3

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
500 505 510

Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
515 520 525

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
530 535 540

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
545 550 555 560

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
565 570 575

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
580 585 590

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys
595 600 605

Asp Asp Asp Asp Lys
610

<210> 39
<211> 470
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 39
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

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

ES 2 693 232 T3

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
130 135 140

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
165 170 175

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
180 185 190

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
195 200 205

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
210 215 220

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
225 230 235 240

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
275 280 285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
305 310 315 320

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
325 330 335

ES 2 693 232 T3

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 340 345 350

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 370 375 380

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr
 450 455 460

Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 465 470

<210> 40
 <211> 238
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

10

<400> 40
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

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

ES 2 693 232 T3

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

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

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
100 105 110

Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 41
<211> 470
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada artificialmente

10 <400> 41
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

ES 2 693 232 T3

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

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

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 130 135 140

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 165 170 175

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 180 185 190

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 195 200 205

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 210 215 220

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 225 230 235 240

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 275 280 285

ES 2 693 232 T3

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
305 310 315 320

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
325 330 335

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
340 345 350

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
355 360 365

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro His His
450 455 460

His His His His His His
465 470

<210> 42
<211> 734
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada artificialmente

10 <400> 42
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

ES 2 693 232 T3

Val His Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser
 20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val
 35 40 45

Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu
 50 55 60

Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro
 65 70 75 80

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

Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp
 100 105 110

Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 130 135 140

Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser
 145 150 155 160

Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala
 165 170 175

Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 180 185 190

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 195 200 205

Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu
 210 215 220

Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
 225 230 235 240

Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala
 245 250 255

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly
 260 265 270

ES 2 693 232 T3

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

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

Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile
 305 310 315 320

Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro
 325 330 335

Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr
 340 345 350

Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser
 355 360 365

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

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

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 405 410 415

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 420 425 430

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 435 440 445

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 450 455 460

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 465 470 475 480

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 485 490 495

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 500 505 510

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 515 520 525

ES 2 693 232 T3

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
530 535 540

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
545 550 555 560

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
565 570 575

Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
580 585 590

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
595 600 605

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
610 615 620

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr
625 630 635 640

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
645 650 655

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
660 665 670

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
675 680 685

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
690 695 700

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
705 710 715 720

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
725 730

<210> 43
<211> 462
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada artificialmente

10 <400> 43

ES 2 693 232 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

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

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 130 135 140

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 165 170 175

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 180 185 190

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 195 200 205

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 210 215 220

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 225 230 235 240

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 245 250 255

ES 2 693 232 T3

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
275 280 285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
305 310 315 320

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
325 330 335

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
340 345 350

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
355 360 365

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
450 455 460

<210> 44
<211> 246
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada artificialmente

10 <400> 44

ES 2 693 232 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

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

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

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

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys His His
 225 230 235 240

His His His His His His
 245

<210> 45
 <211> 505
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

10 <400> 45

ES 2 693 232 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

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

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

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

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 195 200 205

ES 2 693 232 T3

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210 215 220
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser
 245 250 255
 Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser
 260 265 270
 Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu
 275 280 285
 Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg
 290 295 300
 Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys
 305 310 315 320
 Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr
 325 330 335
 Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr
 340 345 350
 Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 355 360 365
 Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 370 375 380
 Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 385 390 395 400
 Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 405 410 415
 Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr
 420 425 430
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
 435 440 445
 Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp
 450 455 460
 Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr
 465 470 475 480
 Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 485 490 495
 Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 500 505

ES 2 693 232 T3

<210> 46
 <211> 729
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

10 <400> 46

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

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

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 130 135 140

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160

ES 2 693 232 T3

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

ES 2 693 232 T3

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
 450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser
 465 470 475 480

Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser
 485 490 495

Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu
 500 505 510

Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg
 515 520 525

Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys
 530 535 540

Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr
 545 550 555 560

Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr
 565 570 575

Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 580 585 590

Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 595 600 605

Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 610 615 620

Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 625 630 635 640

Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr
 645 650 655

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp

ES 2 693 232 T3

660

665

670

Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp
675 680 685

Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr
690 695 700

Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
705 710 715 720

Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
725

<210> 47

<211> 729

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 47

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

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

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
130 135 140

ES 2 693 232 T3

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

ES 2 693 232 T3

Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr
645 650 655

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
660 665 670

Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp
675 680 685

Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr
690 695 700

Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
705 710 715 720

Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
725

<210> 48
<211> 470
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 48
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

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

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

ES 2 693 232 T3

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

ES 2 693 232 T3

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro His His
450 455 460

His His His His His His
465 470

<210> 49
<211> 600
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 49
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

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

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val

ES 2 693 232 T3

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
355 360 365

Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
370 375 380

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
450 455 460

Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
465 470 475 480

Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
485 490 495

Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
500 505 510

Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
515 520 525

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
530 535 540

Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr
545 550 555 560

Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
565 570 575

Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
580 585 590

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
595 600

<210> 50

<211> 584

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

10

<400> 50

ES 2 693 232 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

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

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 130 135 140

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 165 170 175

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 180 185 190

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 195 200 205

ES 2 693 232 T3

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 210 215 220

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 225 230 235 240

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 275 280 285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 325 330 335

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 340 345 350

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
 370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
 450 455 460

ES 2 693 232 T3

Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser
465 470 475 480

Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val
485 490 495

Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu
500 505 510

Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro
515 520 525

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile
530 535 540

Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp
545 550 555 560

Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
565 570 575

His His His His His His His His
580

<210> 51
<211> 605
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 51
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

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

ES 2 693 232 T3

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
130 135 140

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
165 170 175

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
180 185 190

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
195 200 205

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
210 215 220

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
225 230 235 240

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
275 280 285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
305 310 315 320

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
325 330 335

ES 2 693 232 T3

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 340 345 350

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 370 375 380

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
 450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly
 465 470 475 480

Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala
 485 490 495

Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
 500 505 510

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn
 515 520 525

Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile
 530 535 540

Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu
 545 550 555 560

Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe
 565 570 575

Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 580 585 590

Val Thr Val Ser Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 595 600 605

5 <210> 52
 <211> 589
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

ES 2 693 232 T3

<400> 52

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

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

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 130 135 140

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 165 170 175

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 180 185 190

ES 2 693 232 T3

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 195 200 205

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 210 215 220

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 225 230 235 240

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 275 280 285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 325 330 335

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 340 345 350

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
 370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

ES 2 693 232 T3

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
 450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser
 465 470 475 480

Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser
 485 490 495

Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu
 500 505 510

Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg
 515 520 525

Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys
 530 535 540

Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr
 545 550 555 560

Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr
 565 570 575

Lys Leu Thr Val Leu His His His His His His His His
 580 585

<210> 53
 <211> 610
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

10 <400> 53
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

ES 2 693 232 T3

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

ES 2 693 232 T3

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 325 330 335

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 340 345 350

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 370 375 380

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
 450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys
 465 470 475 480

Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys
 485 490 495

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn
 500 505 510

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile
 515 520 525

Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 530 535 540

Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu
 545 550 555 560

Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val

ES 2 693 232 T3

565 570 575

Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp
580 585 590

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
595 600 605

Asp Lys
610

<210> 54
<211> 594
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada artificialmente
10

<400> 54
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

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

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
130 135 140

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
145 150 155 160

ES 2 693 232 T3

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

ES 2 693 232 T3

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

ES 2 693 232 T3

Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
515 520 525

Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr
530 535 540

Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln
545 550 555 560

Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala
565 570 575

Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser
580 585 590

Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Asp
595 600 605

Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
610 615

<210> 56
<211> 599
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 56
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

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

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val

ES 2 693 232 T3

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

ES 2 693 232 T3

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
 370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
 450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 465 470 475 480

Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro
 485 490 495

Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr
 500 505 510

Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe
 515 520 525

Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala
 530 535 540

Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr
 545 550 555 560

Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr
 565 570 575

Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu His
 580 585 590

His His His His His His His
 595

<210> 57
 <211> 610
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

10 <400> 57

ES 2 693 232 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

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

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 130 135 140

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 165 170 175

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 180 185 190

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 195 200 205

ES 2 693 232 T3

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 210 215 220

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 225 230 235 240

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 275 280 285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 325 330 335

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 340 345 350

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 370 375 380

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
 450 455 460

ES 2 693 232 T3

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys
465 470 475 480

Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys
485 490 495

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn
500 505 510

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile
515 520 525

Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
530 535 540

Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu
545 550 555 560

Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val
565 570 575

Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp
580 585 590

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
595 600 605

Asp Lys
610

<210> 58
<211> 594
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada artificialmente

10

<400> 58
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

ES 2 693 232 T3

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

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

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

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 130 135 140

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 165 170 175

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 180 185 190

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 195 200 205

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 210 215 220

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 225 230 235 240

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 275 280 285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 290 295 300

ES 2 693 232 T3

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 325 330 335

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 340 345 350

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
 370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
 450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val
 465 470 475 480

Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr
 485 490 495

Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala
 500 505 510

Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly
 515 520 525

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 530 535 540

Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu
 545 550 555 560

Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
 565 570 575

Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu His His His His His His
 580 585 590

His His

<211> 704
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 59
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 130 135 140
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160

10

ES 2 693 232 T3

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

ES 2 693 232 T3

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
 450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys
 465 470 475 480

Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys
 485 490 495

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn
 500 505 510

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile
 515 520 525

Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 530 535 540

Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu
 545 550 555 560

Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val
 565 570 575

Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp
 580 585 590

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 595 600 605

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 610 615 620

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 625 630 635 640

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 645 650 655

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 660 665 670

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 675 680 685

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 690 695 700

<211> 692
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

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

10

ES 2 693 232 T3

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
180 185 190

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
195 200 205

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
210 215 220

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
225 230 235 240

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
275 280 285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
305 310 315 320

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
325 330 335

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
340 345 350

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
355 360 365

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

ES 2 693 232 T3

420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val
465 470 475 480

Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr
485 490 495

Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala
500 505 510

Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly
515 520 525

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
530 535 540

Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu
545 550 555 560

Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
565 570 575

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg Thr Val Ala Ala Pro
580 585 590

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
595 600 605

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
610 615 620

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
625 630 635 640

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
645 650 655

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
660 665 670

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
675 680 685

Asn Arg Gly Glu
690

5 <210> 61
<211> 115
<212> PRT

ES 2 693 232 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

5

<400> 61

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 62

10

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 62

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

ES 2 693 232 T3

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

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

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 63
 <211> 328
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

10 <400> 63

ES 2 693 232 T3

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 693 232 T3

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 64
 <211> 587
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

10 <400> 64
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

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

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

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

ES 2 693 232 T3

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

ES 2 693 232 T3

Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala
385 390 395 400

Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr
405 410 415

Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr
420 425 430

Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
450 455 460

Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu
465 470 475 480

Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met
485 490 495

Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg
500 505 510

Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
515 520 525

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr
530 535 540

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
545 550 555 560

Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
565 570 575

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
580 585

<210> 65
<211> 328
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia sintetizada artificialmente

10 <400> 65

ES 2 693 232 T3

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 693 232 T3

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

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

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

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

Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 66
 <211> 587
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

10

<400> 66
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

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

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

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

ES 2 693 232 T3

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

ES 2 693 232 T3

Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala
385 390 395 400

Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr
405 410 415

Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr
420 425 430

Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
450 455 460

Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu
465 470 475 480

Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met
485 490 495

Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg
500 505 510

Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
515 520 525

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr
530 535 540

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
545 550 555 560

Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
565 570 575

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
580 585

<210> 67

<211> 141

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
1 5 10 15

10

ES 2 693 232 T3

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
 20 25 30

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr
 35 40 45

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
 50 55 60

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
 65 70 75 80

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp
 85 90 95

Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe
 100 105 110

Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
 115 120 125

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 130 135 140

<210> 68
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 68
 Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro
 1 5 10 15

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 20 25 30

Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
 35 40 45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys
 50 55 60

Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu
 65 70 75 80

Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
 85 90 95

10

ES 2 693 232 T3

Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp
 100 105 110

Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
 115 120 125

Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser
 130 135 140

Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala
 145 150 155 160

Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp
 165 170 175

Ser Arg Gly

<210> 69

<211> 173

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Asp Lys Gln Leu Asp Ala Asp Val Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu
 1 5 10 15

Pro Ser Ile Ala Glu Thr Lys Leu Gln Lys Ala Gly Thr Tyr Leu Cys
 20 25 30

Leu Leu Glu Lys Phe Phe Pro Asp Val Ile Lys Ile His Trp Gln Glu
 35 40 45

Lys Lys Ser Asn Thr Ile Leu Gly Ser Gln Glu Gly Asn Thr Met Lys
 50 55 60

Thr Asn Asp Thr Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro Glu Lys
 65 70 75 80

Ser Leu Asp Lys Glu His Arg Cys Ile Val Arg His Glu Asn Asn Lys
 85 90 95

Asn Gly Val Asp Gln Glu Ile Ile Phe Pro Pro Ile Lys Thr Asp Val
 100 105 110

Ile Thr Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr
 115 120 125

10

Leu Leu Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu
 130 135 140

Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Arg Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
 165 170

ES 2 693 232 T3

<210> 70
 <211> 204
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 70
 Lys Gln Leu Asp Ala Asp Val Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu Pro
 1 5 10 15

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

 Leu Glu Lys Phe Phe Pro Asp Ile Ile Lys Ile His Trp Gln Glu Lys
 35 40 45

 Lys Ser Asn Thr Ile Leu Gly Ser Gln Glu Gly Asn Thr Met Lys Thr
 50 55 60

 Asn Asp Thr Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro Glu Glu Ser
 65 70 75 80

 Leu Asp Lys Glu His Arg Cys Ile Val Arg His Glu Asn Asn Lys Asn
 85 90 95

 Gly Ile Asp Gln Glu Ile Ile Phe Pro Pro Ile Lys Thr Asp Val Thr
 100 105 110

 Thr Val Asp Pro Lys Asp Ser Tyr Ser Lys Asp Ala Asn Asp Val Thr
 115 120 125

 Thr Val Asp Pro Lys Tyr Asn Tyr Ser Lys Asp Ala Asn Asp Val Ile
 130 135 140

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

 Leu Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu
 165 170 175

 Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu
 180 185 190

 Gly Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
 195 200

10

<210> 71
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 71

ES 2 693 232 T3

Pro Ser Tyr Thr Gly Gly Tyr Ala Asp Lys Leu Ile Phe Gly Lys Gly
1 5 10 15

Thr Arg Val Thr Val Glu Pro Arg Ser Gln Pro His Thr Lys Pro Ser
20 25 30

Val Phe Val Met Lys Asn Gly Thr Asn Val Ala Cys Leu Val Lys Glu
35 40 45

Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Arg Ile Asn Leu Val Ser Ser Lys Lys Ile
50 55 60

Thr Glu Phe Asp Pro Ala Ile Val Ile Ser Pro Ser Gly Lys Tyr Asn
65 70 75 80

Ala Val Lys Leu Gly Lys Tyr Glu Asp Ser Asn Ser Val Thr Cys Ser
85 90 95

Val Gln His Asp Asn Lys Thr Val His Ser Thr Asp Phe Glu Val Lys
100 105 110

Thr Asp Ser Thr Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu Asn Thr Lys
115 120 125

Gln Pro Ser Lys Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val His Thr Glu
130 135 140

Lys Val Asn Met Met Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg Met Leu Phe
145 150 155 160

Ala Lys Thr Val Ala Val Asn Phe Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe
165 170 175

Leu
<210> 72
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Señal en secuencia

<400> 72
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

10 Val His Ser
<210> 73
<211> 466
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Secuencia sintetizada artificialmente
<400> 73

ES 2 693 232 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser
 20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val
 35 40 45

Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu
 50 55 60

Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro
 65 70 75 80

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

Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp
 100 105 110

Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 115 120 125

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 130 135 140

ES 2 693 232 T3

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
145 150 155 160

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
165 170 175

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
195 200 205

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
210 215 220

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
225 230 235 240

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
245 250 255

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
260 265 270

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
275 280 285

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
290 295 300

Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
305 310 315 320

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
325 330 335

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
340 345 350

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
355 360 365

Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly
370 375 380

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

ES 2 693 232 T3

```
385                      390                      395                      400

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
      405                      410                      415

Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
      420                      425                      430

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
      435                      440                      445

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
      450                      455                      460

Asp Lys
465

<210> 74
<211> 251
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 74
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1                      5                      10                      15

Val His Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
      20                      25                      30

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

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

Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
      65                      70                      75                      80

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

Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr
      100                     105                     110

Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
      115                     120                     125
```

ES 2 693 232 T3

Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135 140

Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 145 150 155 160

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 165 170 175

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 180 185 190

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 195 200 205

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 210 215 220

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 225 230 235 240

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 245 250

<210> 75

<211> 484

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 75

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

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

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

Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
 65 70 75 80

ES 2 693 232 T3

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 85 90 95
 Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
 115 120 125
 Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135 140
 Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 145 150 155 160
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 165 170 175
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 180 185 190
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 195 200 205
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 210 215 220
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 225 230 235 240
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr
 245 250 255
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
 260 265 270
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 275 280 285
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 290 295 300
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 305 310 315 320
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 325 330 335

ES 2 693 232 T3

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 340 345 350

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 355 360 365

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 370 375 380

Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
 385 390 395 400

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 405 410 415

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 420 425 430

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 435 440 445

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 450 455 460

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp
 465 470 475 480

Asp Asp Asp Lys

<210> 76

<211> 233

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

10

<400> 76

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser
 20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val
 35 40 45

ES 2 693 232 T3

Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu
50 55 60

Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro
65 70 75 80

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

Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp
100 105 110

Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
115 120 125

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
130 135 140

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
145 150 155 160

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
165 170 175

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
195 200 205

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
210 215 220

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230

<210> 77

<211> 466

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

10

<400> 77

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

ES 2 693 232 T3

Val His Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser
 20 25 30

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

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

Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro
 65 70 75 80

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

Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp
 100 105 110

Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 115 120 125

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 130 135 140

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 145 150 155 160

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 165 170 175

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 195 200 205

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 210 215 220

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 225 230 235 240

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 245 250 255

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 260 265 270

ES 2 693 232 T3

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
275 280 285

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
290 295 300

Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
305 310 315 320

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
325 330 335

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
340 345 350

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
355 360 365

Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly
370 375 380

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
385 390 395 400

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
405 410 415

Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
420 425 430

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
435 440 445

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
450 455 460

Asp Lys
465

<210> 78

<211> 251

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

10

<400> 78

ES 2 693 232 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

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

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

Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
 65 70 75 80

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr
 100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile
 115 120 125

Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 145 150 155 160

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 165 170 175

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 180 185 190

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 195 200 205

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 210 215 220

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 225 230 235 240

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 245 250

<210> 79
 <211> 475
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

10 <400> 79

ES 2 693 232 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val
 20 25 30

Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala
 35 40 45

Phe Thr Asn Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly
 50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ile His Tyr
 65 70 75 80

Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser
 85 90 95

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

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Arg Asn Trp Asp Glu Pro Met Asp Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

ES 2 693 232 T3

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
 245 250 255

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser
 305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365

Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 370 375 380

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Ser Pro His His His His His His His
 465 470 475

- 5 <210> 80
- <211> 239
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

10 <220>

ES 2 693 232 T3

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 80

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
20 25 30

Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
50 55 60

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

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

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

Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

5

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 81

<211> 453

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

15

<400> 81

ES 2 693 232 T3

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

ES 2 693 232 T3

165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

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

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

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

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

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro
450

ES 2 693 232 T3

<210> 82
 <211> 216
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

 10 <400> 82
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15

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

 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45

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

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

 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg Thr Val
 100 105 110

 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 115 120 125

 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140

 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160

 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175

 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190

 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205

 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

 15 <210> 83
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 693 232 T3

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

5

<400> 83

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

ES 2 693 232 T3

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

ES 2 693 232 T3

<210> 84
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 84
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

10

15

20

<210> 85
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

ES 2 693 232 T3

<400> 85

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr
 115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140

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

ES 2 693 232 T3

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Lys Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300

Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335

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

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

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
 405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro
 450

ES 2 693 232 T3

<210> 86
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 86
 Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly
 35 40 45
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg Thr Val
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 115 120 125
 Ser Gly Thr Ala Glu Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 130 135 140
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 145 150 155 160
 Ser Glu Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Thr Leu Glu Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 180 185 190
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

10

15

<210> 87
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 693 232 T3

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 87

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

ES 2 693 232 T3

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

ES 2 693 232 T3

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

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

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

<210> 88

<211> 443

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

10

<400> 88

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

ES 2 693 232 T3

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Glu Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

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

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

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 89
 <211> 219

ES 2 693 232 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 89
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

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

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

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

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Lys Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Lys Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Lys Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

10 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 90
 <211> 219
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

20 <400> 90

ES 2 693 232 T3

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

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

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

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

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

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Lys Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Lys Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Lys Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

5 <210> 91
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 91

ES 2 693 232 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln
 20 25 30

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

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

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr
 65 70 75 80

Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
 85 90 95

Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp
 115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 145 150 155 160

ES 2 693 232 T3

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
 245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr
 305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380

Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

ES 2 693 232 T3

405

410

415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Pro His His His His His His His His
465 470

<210> 92

<211> 233

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10

<223> Secuencia sintetizada artificialmente

<400> 92

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
35 40 45

Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg
50 55 60

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

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser
85 90 95

Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn
100 105 110

Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

ES 2 693 232 T3

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

REIVINDICACIONES

1. Un complejo polipeptídico que comprende:
- (1) un dominio de unión al antígeno canceroso;
- (2) uno cualquiera de los dominios Fc de las SEQ ID NOs: 23, 24, 25 y 26 en el que se muta un aminoácido(s) que forma(n) el dominio Fc, en donde el mutante del dominio Fc ha reducido la actividad de unión al receptor Fc γ por dicha mutación en comparación con el complejo polipeptídico de control que comprende el dominio Fc del mismo isotipo seleccionado de SEQ ID NOs: 23, 24, 25 y 26, y en donde el mutante del dominio Fc ha reducido la actividad de unión a Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIIA, y/o Fc γ RIIIB; y
- (3) un dominio de unión a CD3,
- en donde el dominio de unión a antígeno y el dominio de unión a CD3 son cada uno un Fab monovalente, y en donde
- (i) el fragmento Fv de cadena pesada de un Fab monovalente que forma el dominio de unión a antígeno está vinculado a uno de los polipéptidos que forman el dominio Fc a través de un dominio CH1 y el fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CL; y el fragmento Fv de cadena pesada del Fab que forma el dominio de unión a CD3 está vinculado al otro polipéptido que forma el dominio Fc a través de un dominio CH1 y el fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CL;
- (ii) el fragmento Fv de cadena pesada de un Fab monovalente que forma el dominio de unión a antígeno está vinculado a uno de los polipéptidos que forman el dominio Fc a través de un dominio CH1 y el fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CL; y el fragmento Fv de cadena pesada del Fab que forma el dominio de unión a CD3 está vinculado al otro polipéptido que forma el dominio Fc a través de un dominio CH1 y el fragmento Fv de cadena pesada del Fab está vinculado a un dominio CL;
- (iii) el fragmento Fv de cadena pesada de un Fab monovalente que forma el dominio de unión a antígeno está vinculado a uno de los polipéptidos que forman el dominio Fc a través de un dominio CH1; el fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CL; el fragmento Fv de cadena pesada del Fab que forma el dominio de unión a CD3 está vinculado al otro polipéptido que forma el dominio Fc a través de un dominio CL; y el fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CH1;
- (iv) el fragmento Fv de cadena pesada de un Fab monovalente que forma el dominio de unión a CD3 está vinculado a uno de los polipéptidos que forman el dominio Fc a través de un dominio CH1; el fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CL; el fragmento Fv de cadena ligera del Fab que forma el dominio de unión a antígeno está vinculado al otro polipéptido que forma el dominio Fc a través de un dominio CH1; y el fragmento Fv de cadena pesada del Fab está vinculado a un dominio CL;
- (v) el fragmento Fv de cadena pesada de un Fab monovalente que forma el dominio de unión a CD3 está vinculado a uno de los polipéptidos que forman el dominio Fc a través de un dominio CH1; el fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CL; el fragmento Fv de cadena pesada del Fab que forma el dominio de unión a antígeno está vinculado al otro polipéptido que forma el dominio Fc a través de un dominio CL; y el fragmento Fv de cadena ligera del Fab está vinculado a un dominio CH1.
2. El complejo polipeptídico de la reivindicación 1, en donde el dominio Fc comprende uno cualquiera de los aminoácidos a continuación:
- la secuencia de aminoácido de posiciones 118 a 260 (numeración de la UE) es la secuencia descrita en SEQ ID NO: 24; o
- la secuencia de aminoácido de posiciones 261 a 447 (numeración de la UE) es la secuencia descrita en SEQ ID NO: 26.
3. El complejo polipeptídico de la reivindicación 1, en donde el dominio Fc comprende una mutación en los aminoácidos de SEQ ID NO: 23 que forman el dominio Fc y en donde los aminoácidos que forman el dominio Fc comprenden una mutación en una cualquiera de las siguientes posiciones: 220, 226, 229, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 264, 265, 266, 267, 269, 270, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 325, 327, 328, 329, 330, 331 y 332 (numeración de la UE).
4. El complejo polipeptídico de la reivindicación 3,
- i) en donde el dominio Fc está en el dominio Fc que comprende una sustitución del aminoácido en la posición 233, 234, 235, 236, 237, 327, 330 o 331 (numeración de la UE) con el aminoácido en una posición correspondiente (numeración de la UE) en IgG2 o IgG4 correspondiente;
- o
- ii) en donde el dominio Fc comprende una mutación de aminoácidos en la posición 234, 235, o 297 (numeración de la UE); y el(los) aminoácido(s) en la posición 234, 235, y/o 297 es(son) sustituido(s) con alanina.
5. El complejo polipeptídico de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde las secuencias de dos polipéptidos que forman el dominio Fc son diferentes entre sí, y en donde el aminoácido en la posición 349 es sustituido con cisteína y el aminoácido en la posición 366 (numeración de la UE) es sustituido con triptófano entre los residuos de aminoácido de uno de los dos polipéptidos que forman el dominio Fc; y en donde el aminoácido en la posición 356 es sustituido con cisteína, el aminoácido en la posición 366 es sustituido con serina, el aminoácido en la posición 368 es sustituido con alanina, y el aminoácido en la posición 407 (numeración de la UE) es sustituido con valina entre los residuos de aminoácidos del otro polipéptido.

- 5 6. El complejo polipeptídico de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde las secuencias de dos polipéptidos que forman el dominio Fc son diferentes entre sí, y en donde el aminoácido en la posición 356 (numeración de la UE) es sustituido con lisina entre los residuos de aminoácido de uno de los dos polipéptidos que forman el dominio Fc; el aminoácido en la posición 439 (numeración de la UE) es sustituido con ácido glutámico en el otro polipéptido, y el aminoácido en la posición 435 (numeración de la UE) es sustituido con arginina entre los residuos de aminoácidos de cualquiera de los dos polipéptidos.
7. El complejo polipeptídico de la reivindicación 5 o 6, en donde la secuencia GK es deletada de los extremos carboxiterminales de dos polipéptidos que forman el dominio Fc.
- 10 8. Un agente terapéutico para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer, que comprende como principio activo el complejo polipeptídico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Un agente terapéutico para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer de la reivindicación 8, en donde el cáncer es cáncer hepático o cáncer de pulmón.

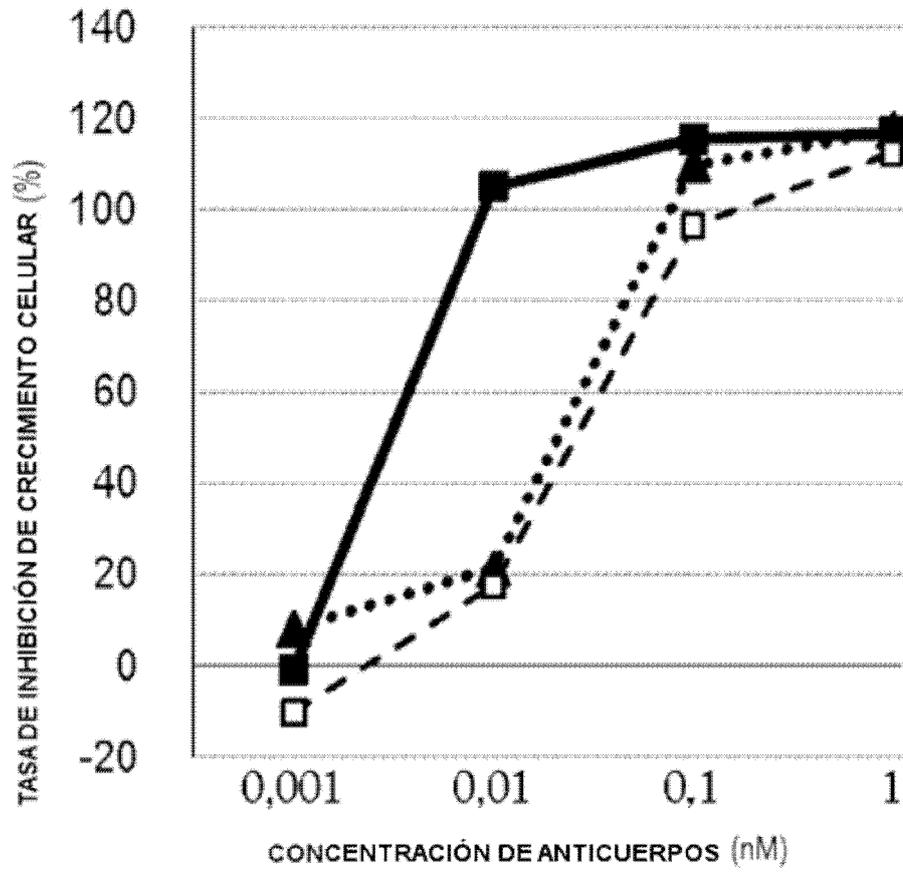


FIG. 1

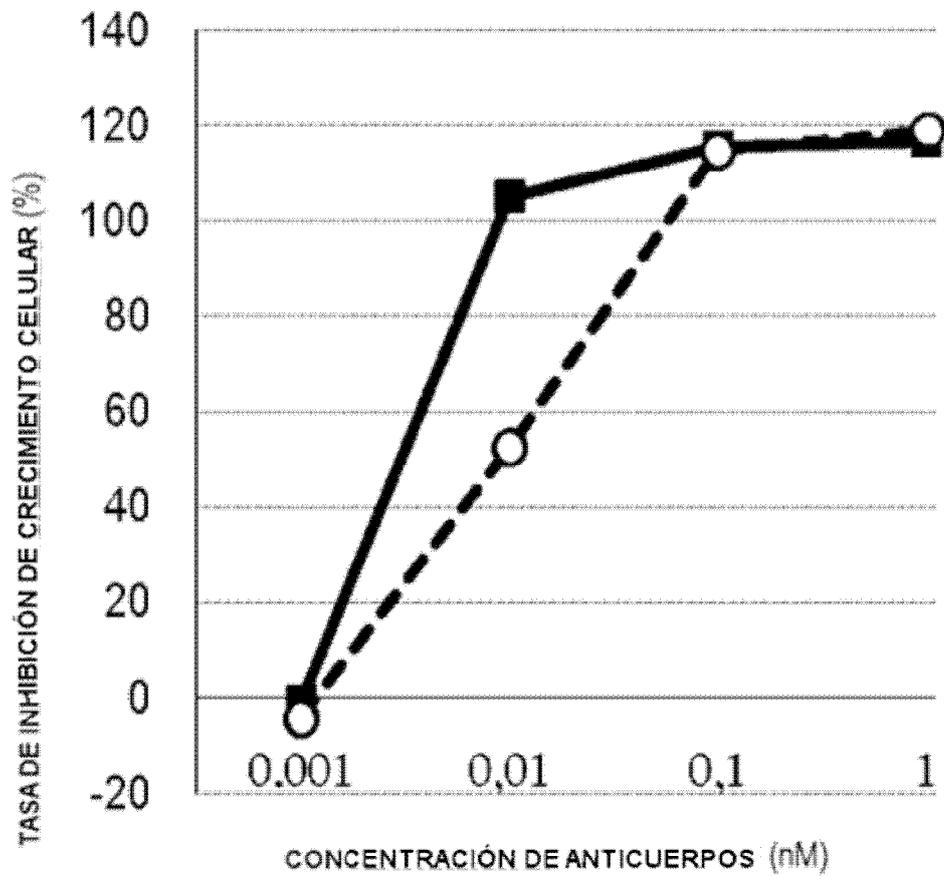


FIG. 2

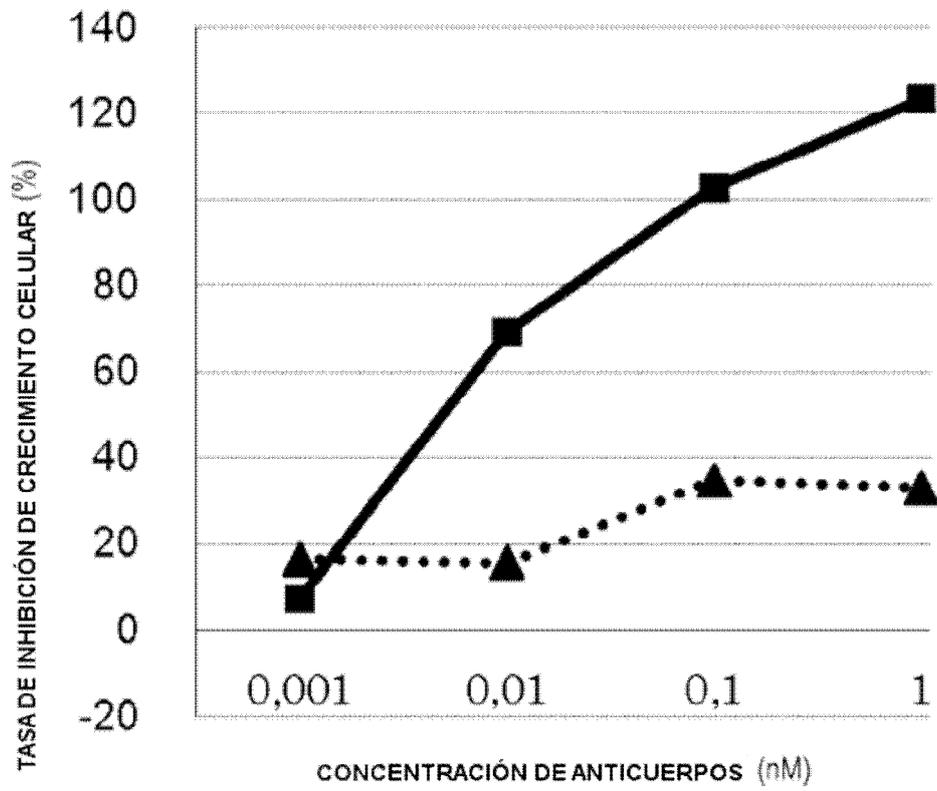


FIG. 3

4/26

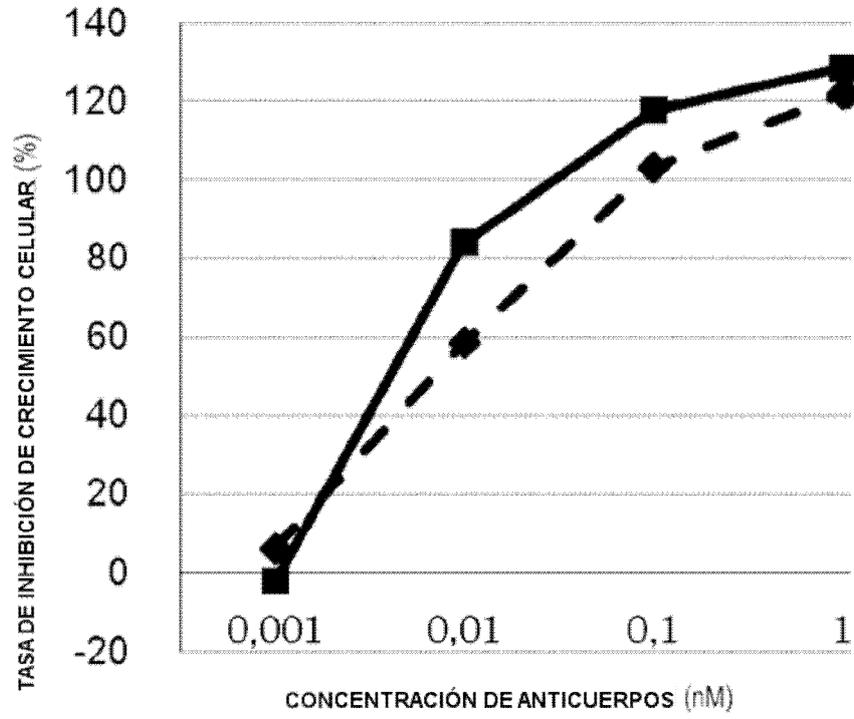


FIG. 4

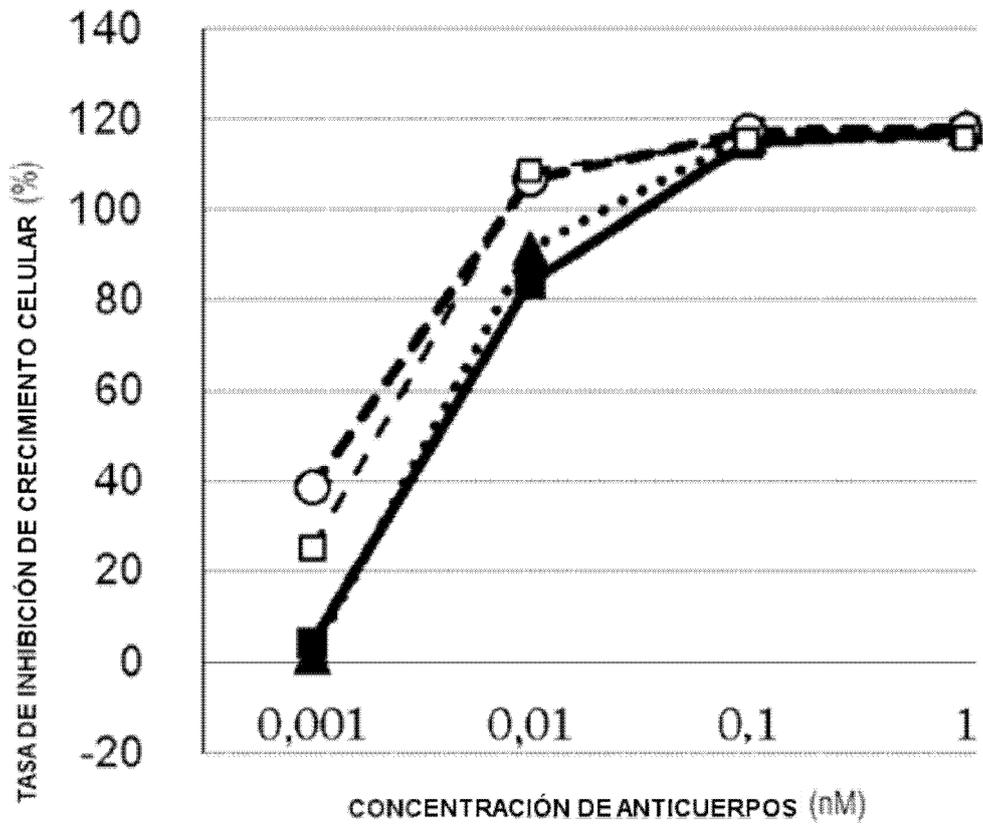


FIG. 5

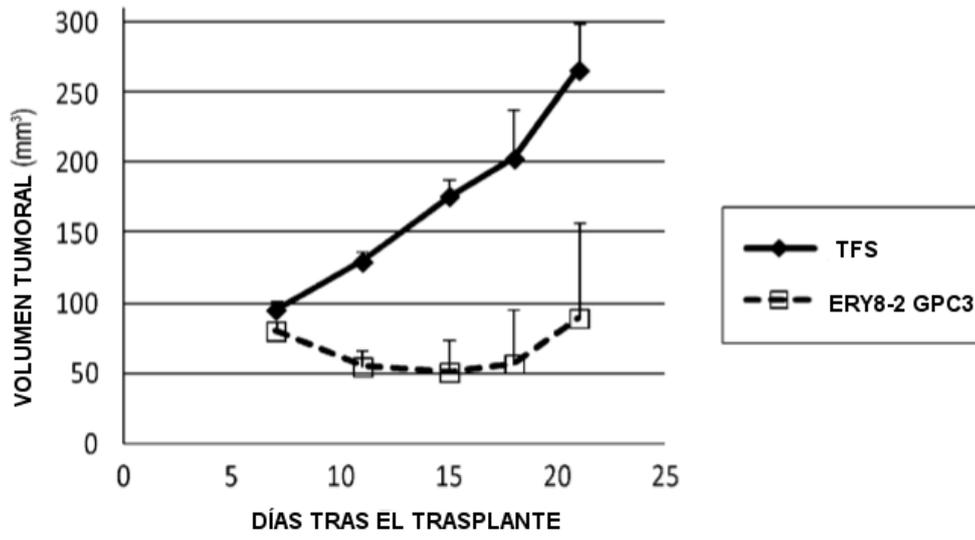


FIG. 6

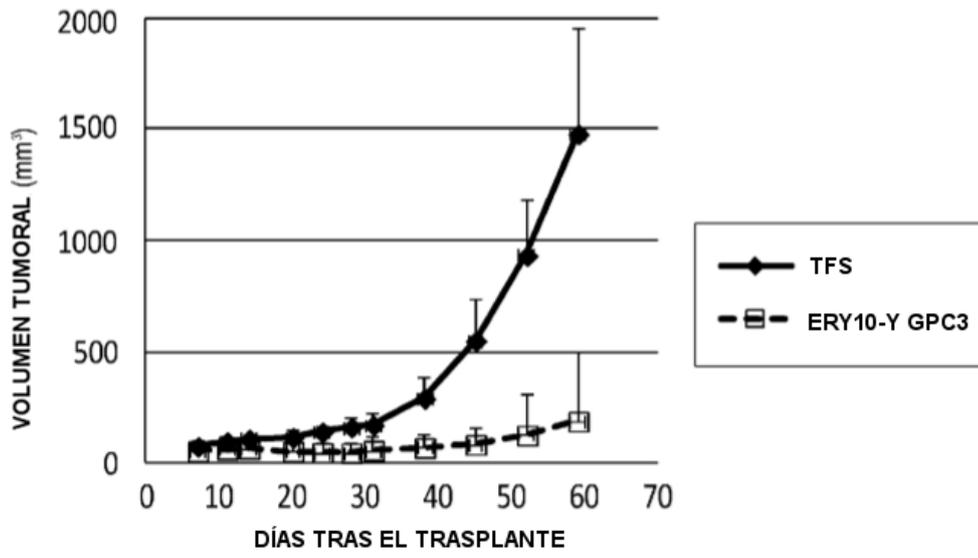


FIG. 7

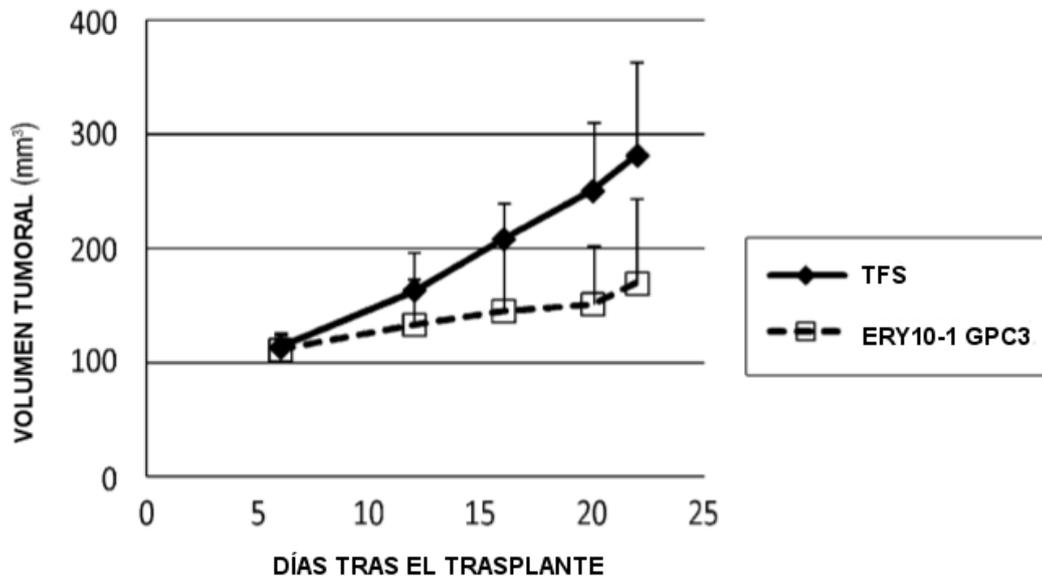


FIG. 8

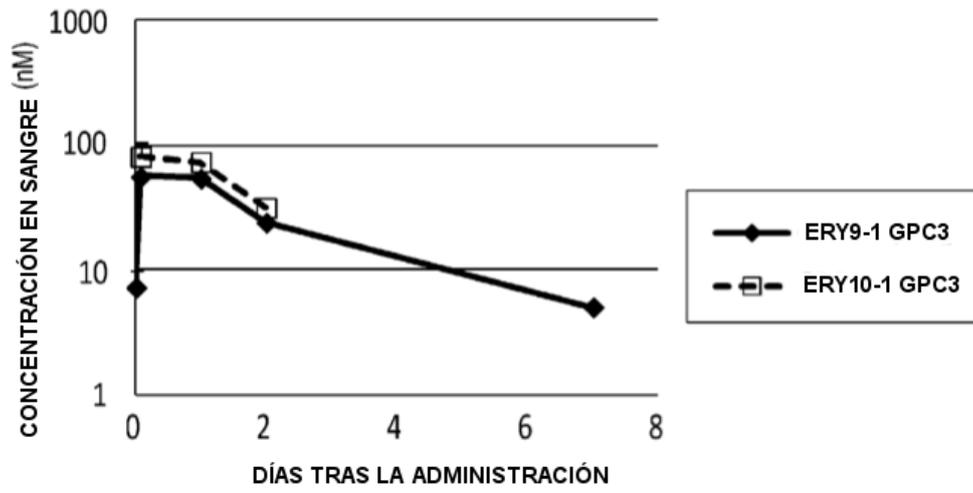


FIG. 9

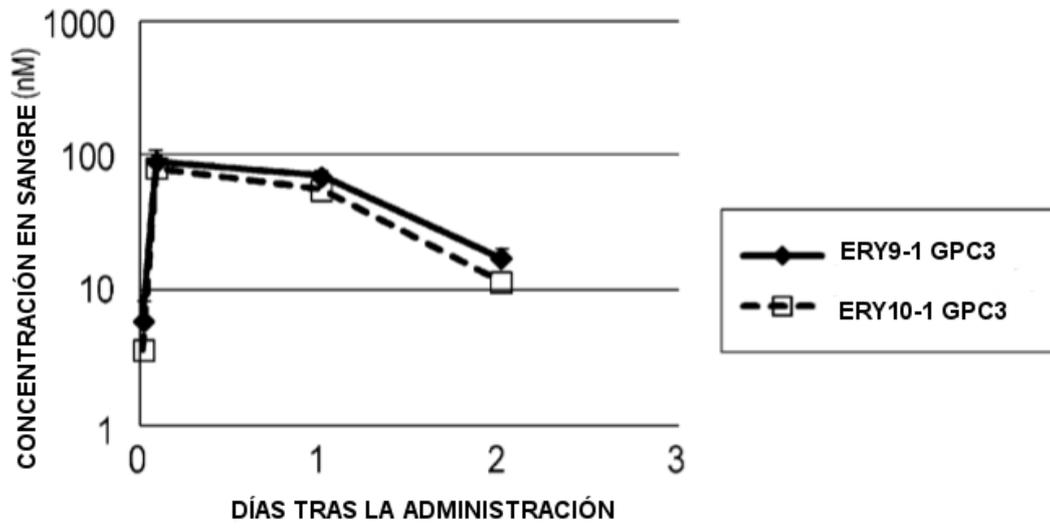


FIG. 10

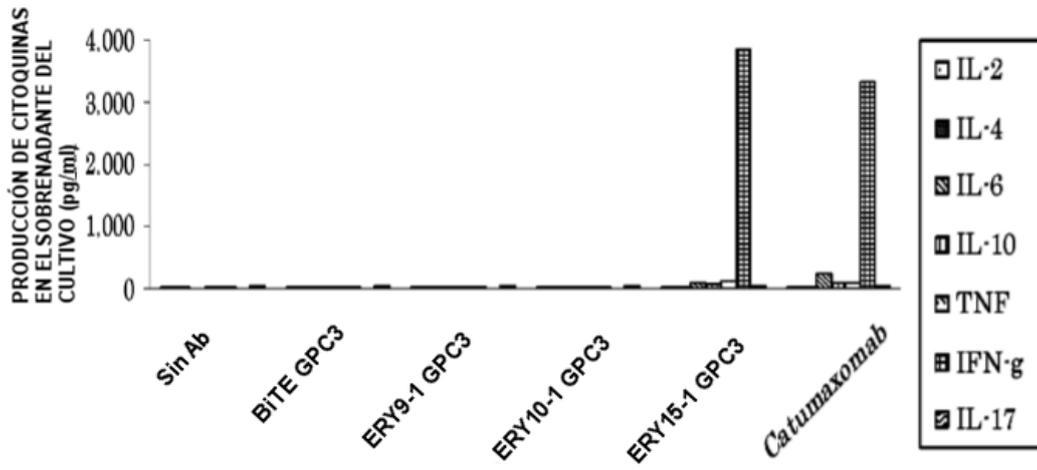


FIG. 11

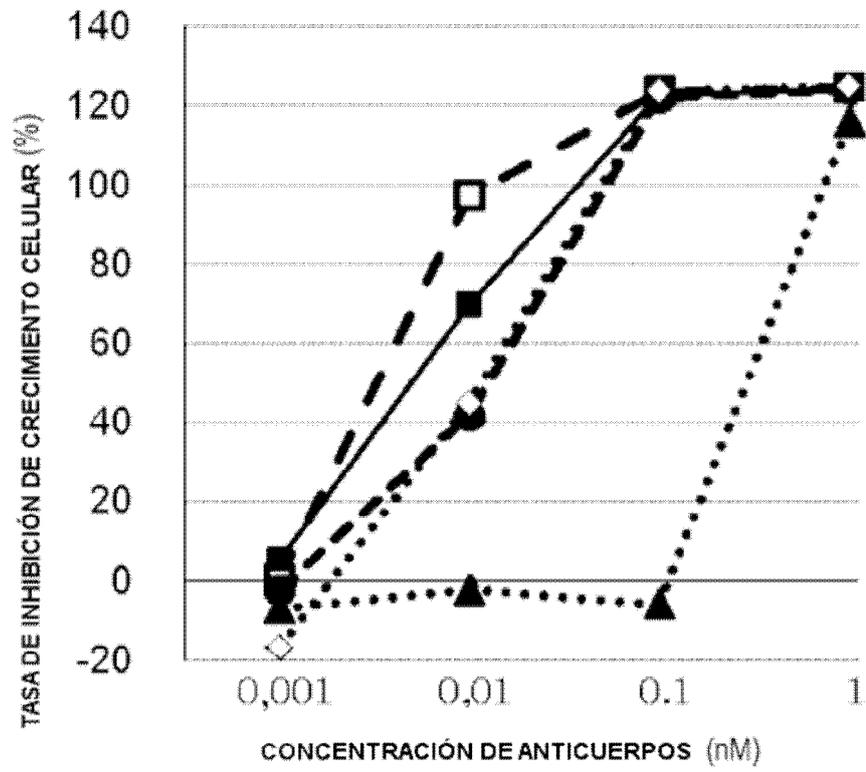


FIG. 12

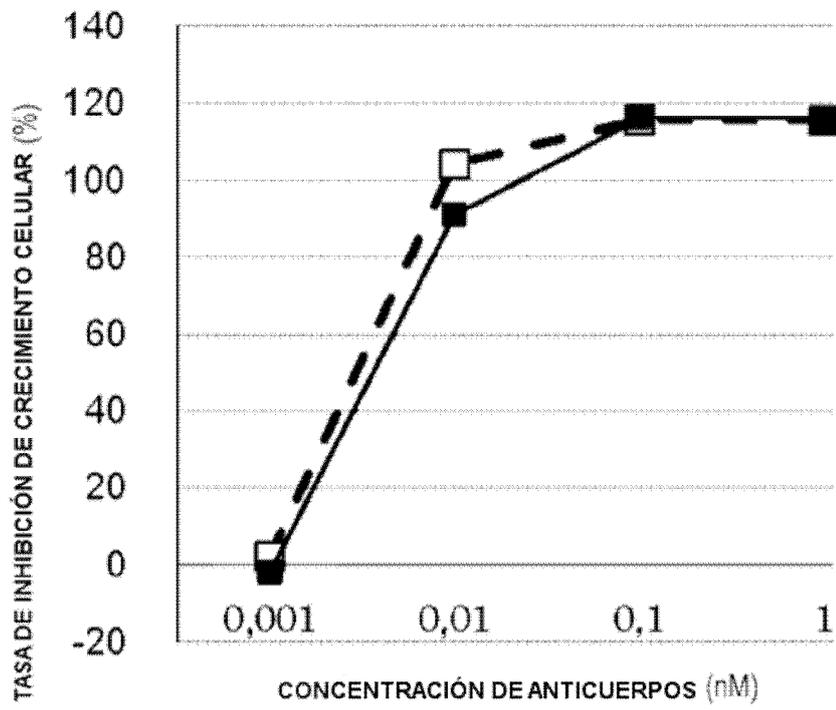


FIG. 13

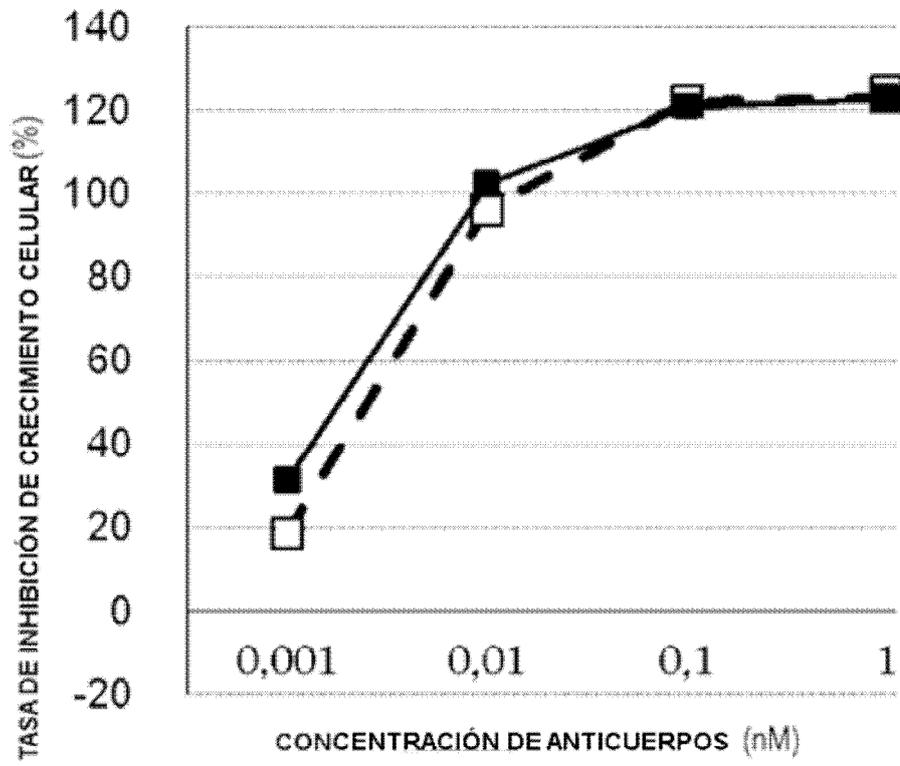


FIG. 14

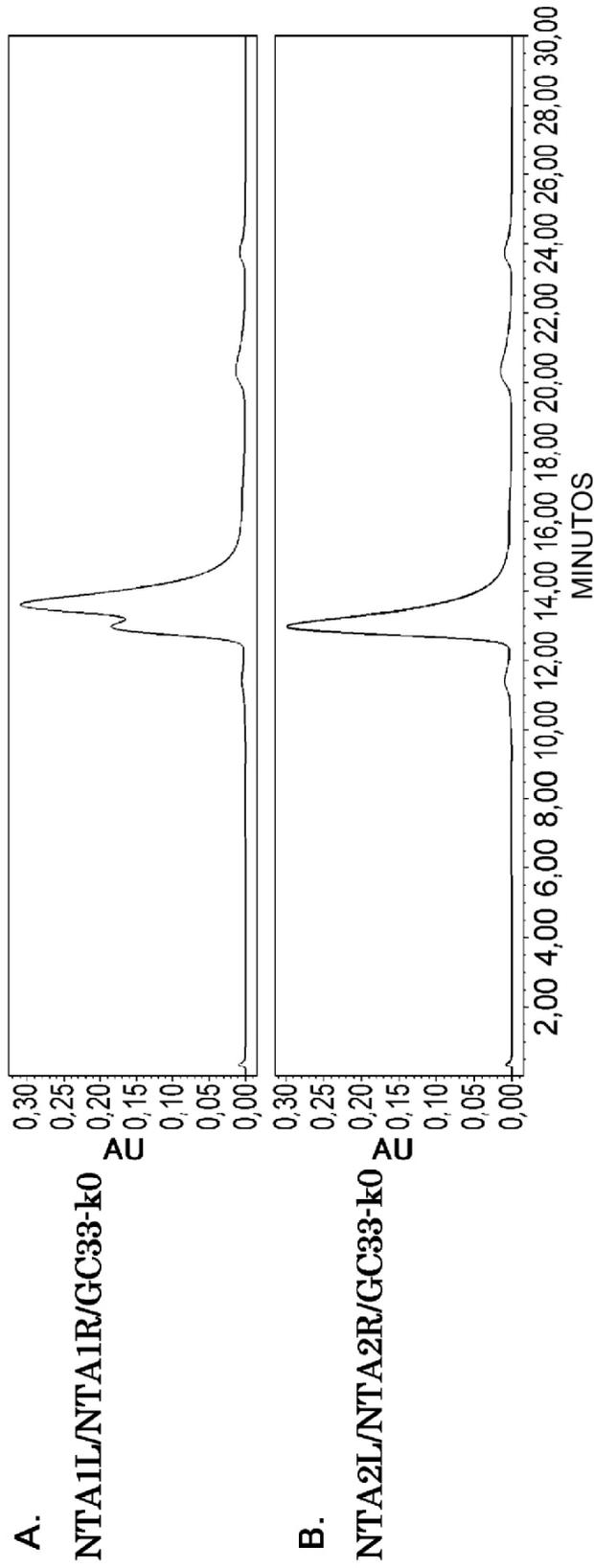


FIG. 15

-  REGIÓN VARIABLE DE LA CADENA P DEL ANTICUERPO DEL ANTÍGENO ANTI-CANCERÍGENO (GPC3, EpCAM, EGFR)
-  REGIÓN VARIABLE DE LA CADENA L DEL ANTICUERPO DEL ANTÍGENO ANTI-CANCERÍGENO (GPC3, EpCAM, EGFR)
-  REGIÓN VARIABLE DE LA CADENA P DEL ANTICUERPO ANTI-CD3
-  REGIÓN VARIABLE DE LA CADENA L DEL ANTICUERPO ANTI-CD3
-  REGIÓN CONSTANTE DEL ANTICUERPO
-  MUTACIÓN F_c SILENCIOSA
-  MUTACIÓN QUE PROMUEVE LA ASOCIACIÓN DE F_c HETEROMÉRICA

FIG. 16

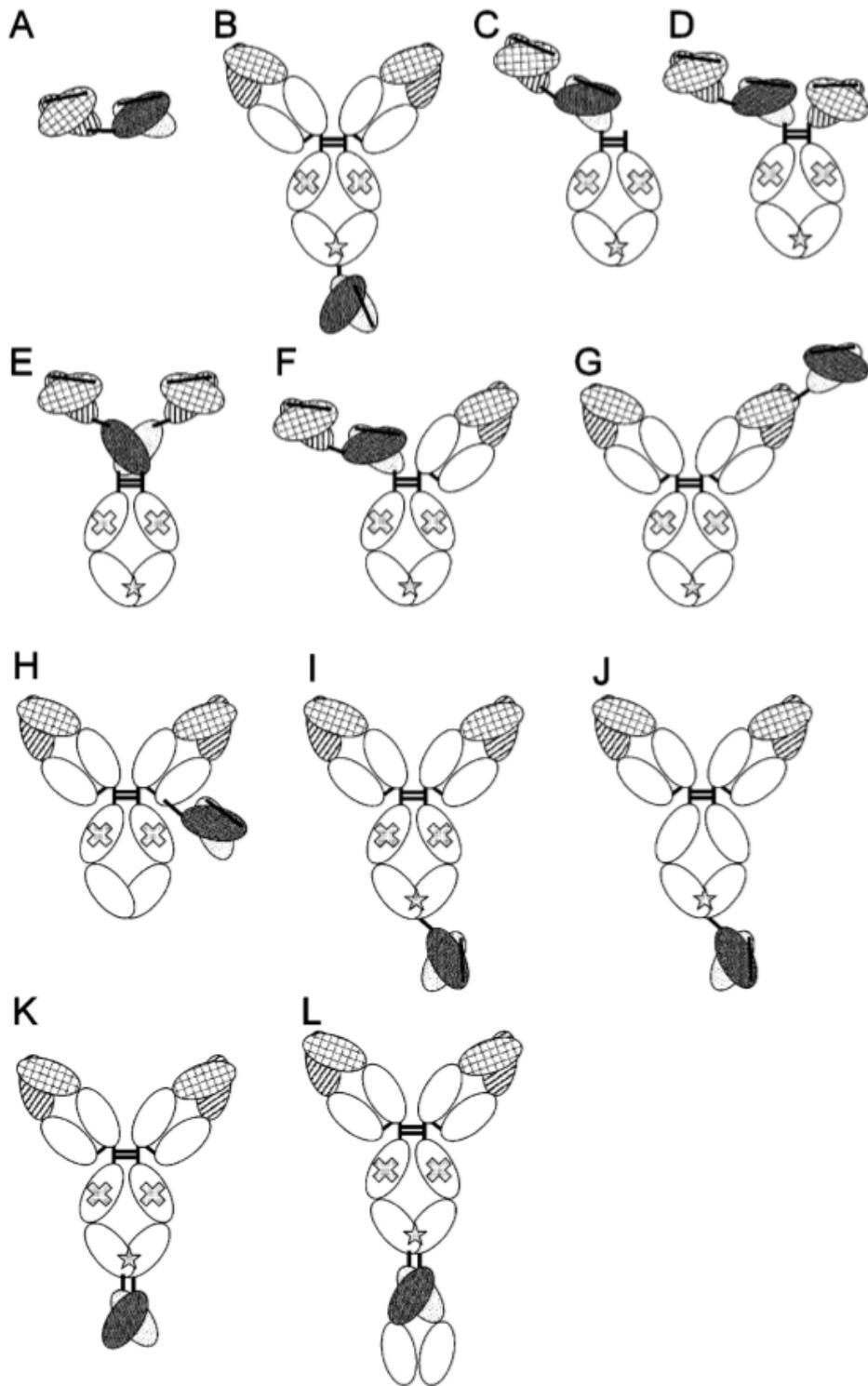


FIG. 17

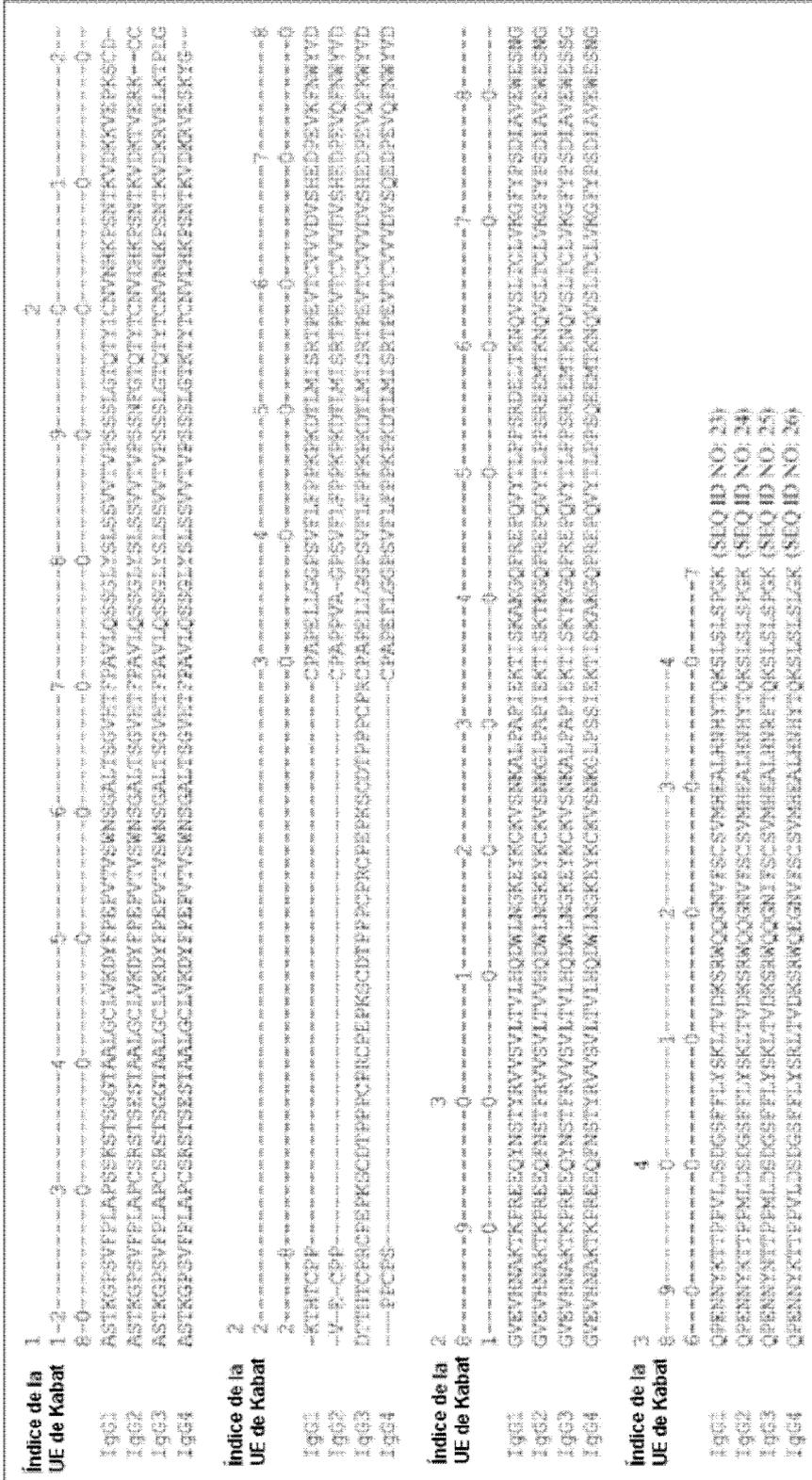


FIG. 18

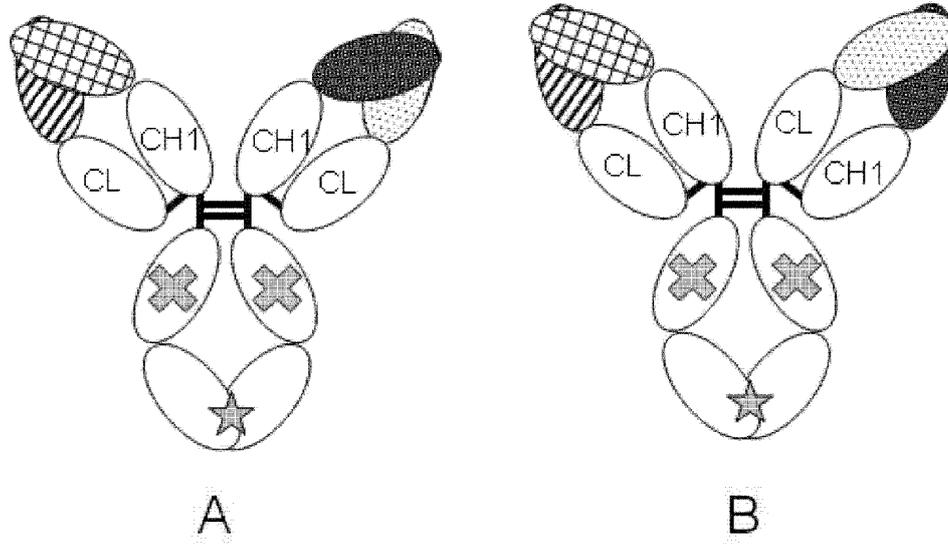


FIG. 19

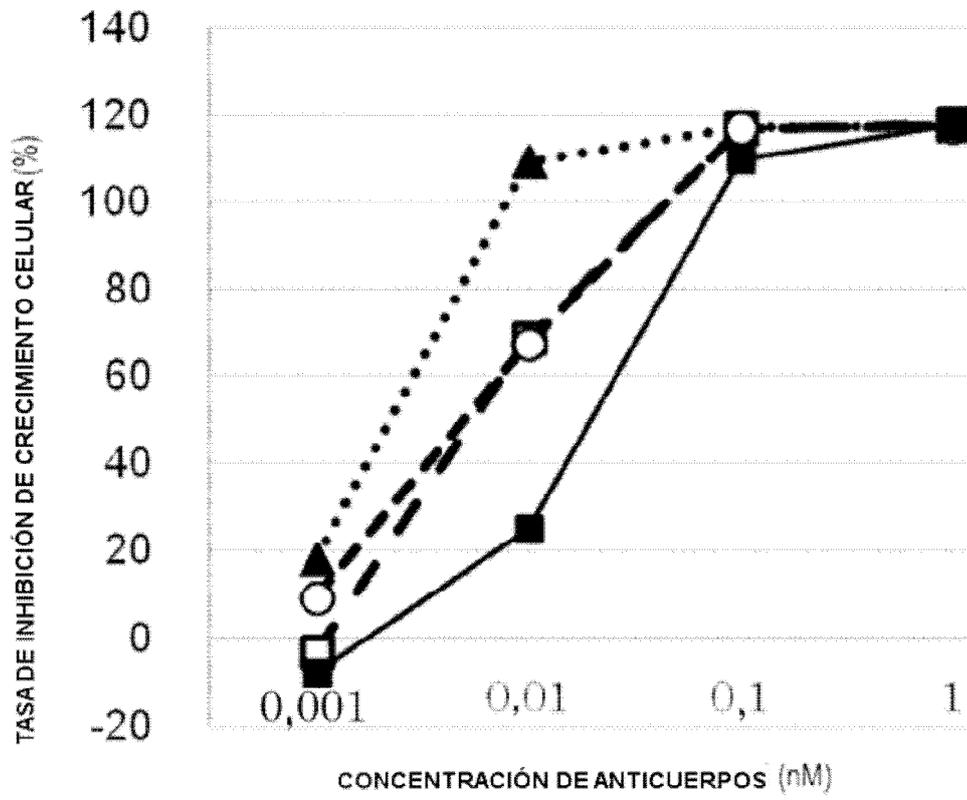


FIG. 20

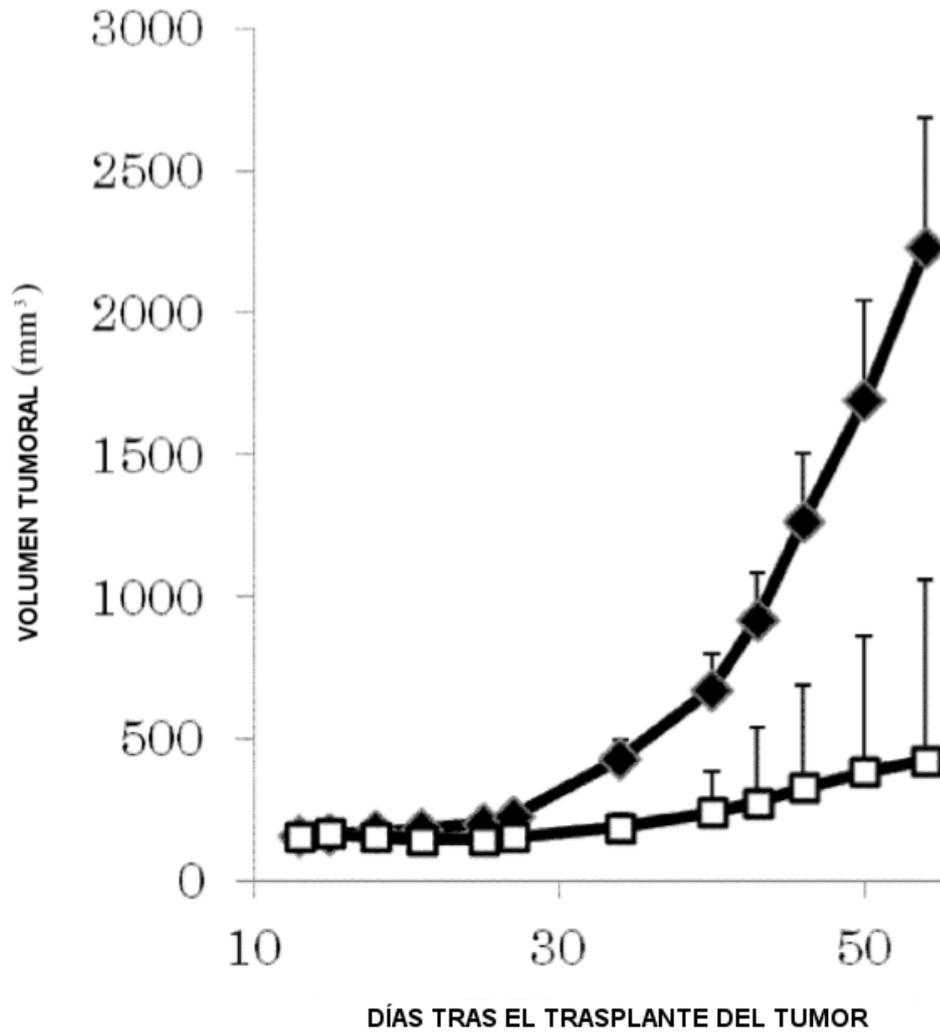


FIG. 21

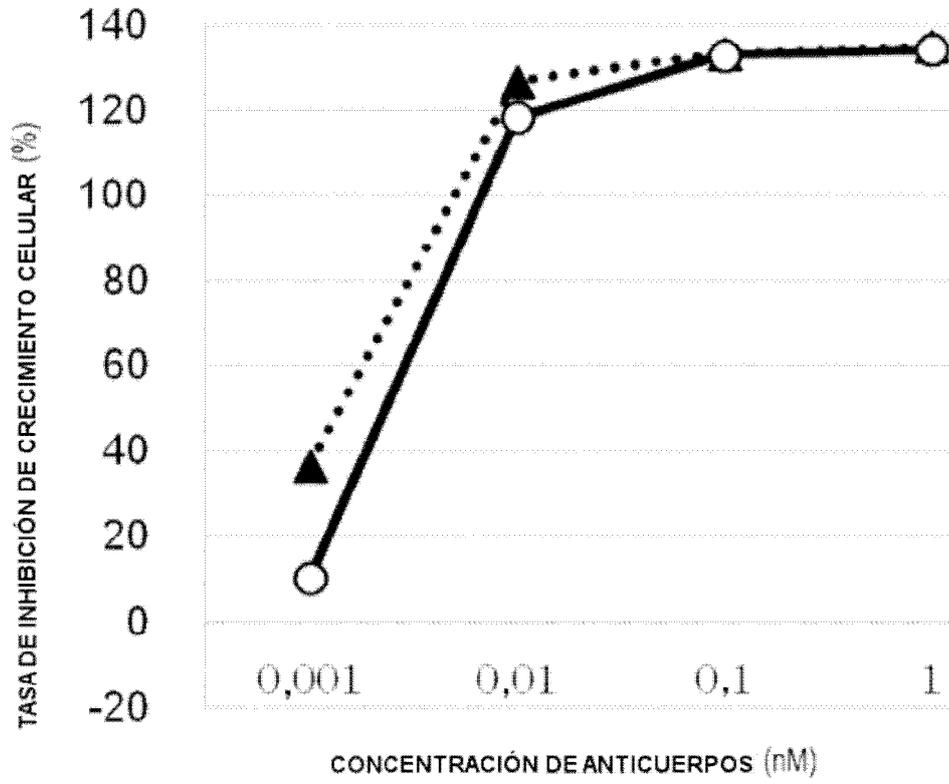


FIG. 22

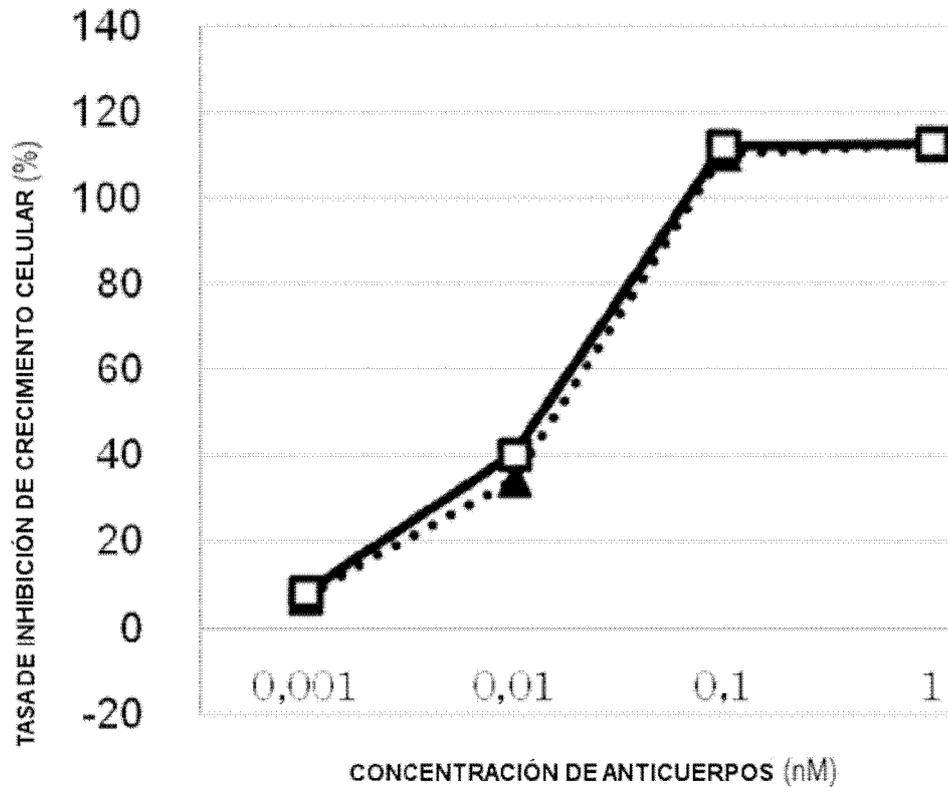


FIG. 23

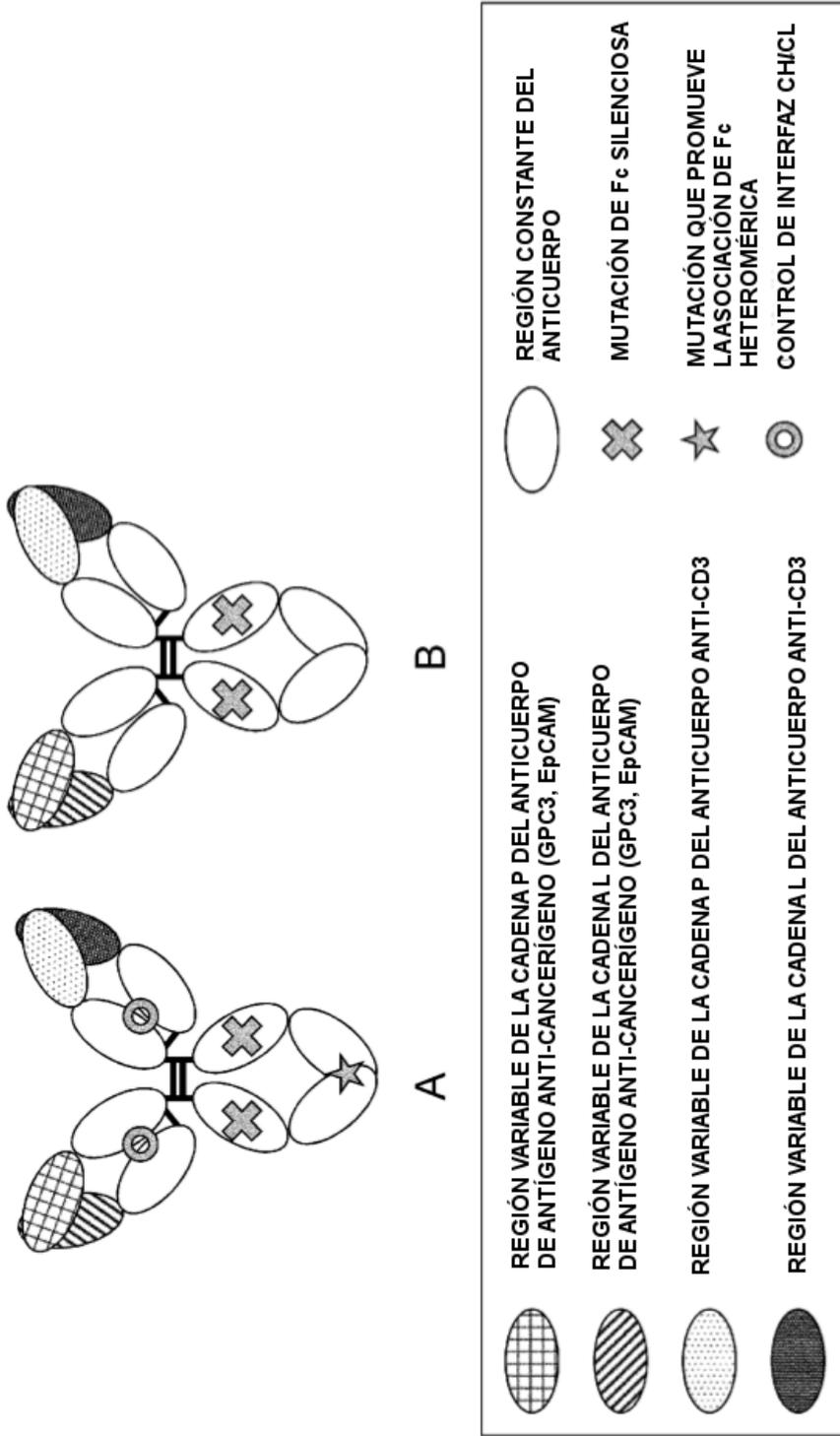


FIG. 24

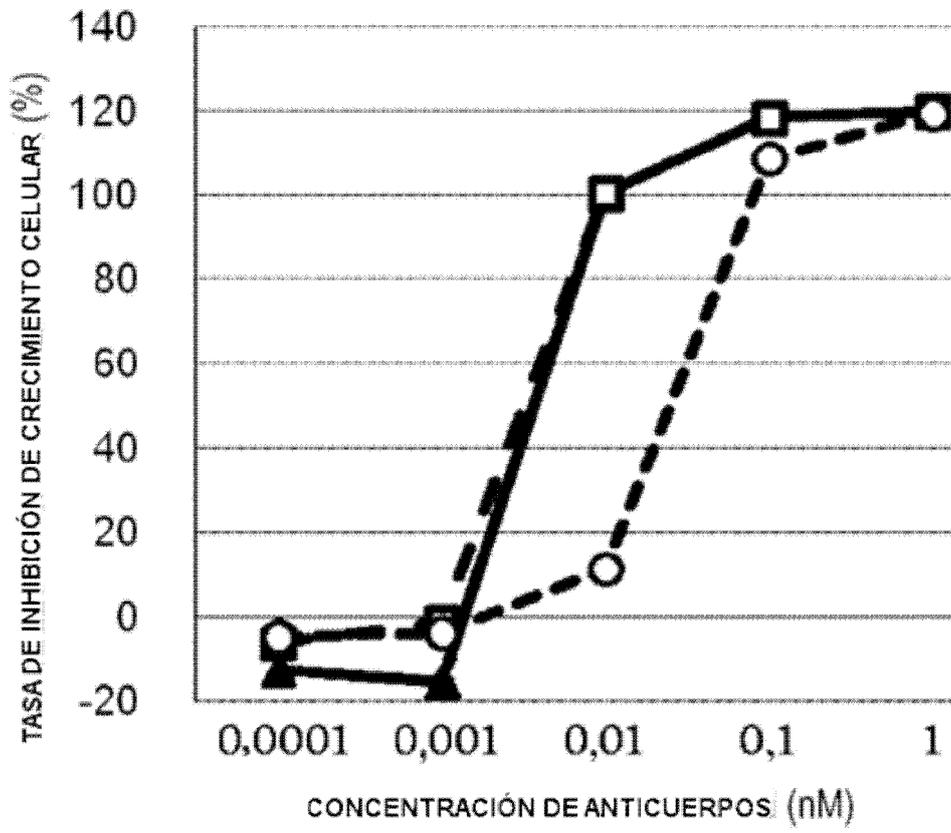


FIG. 25

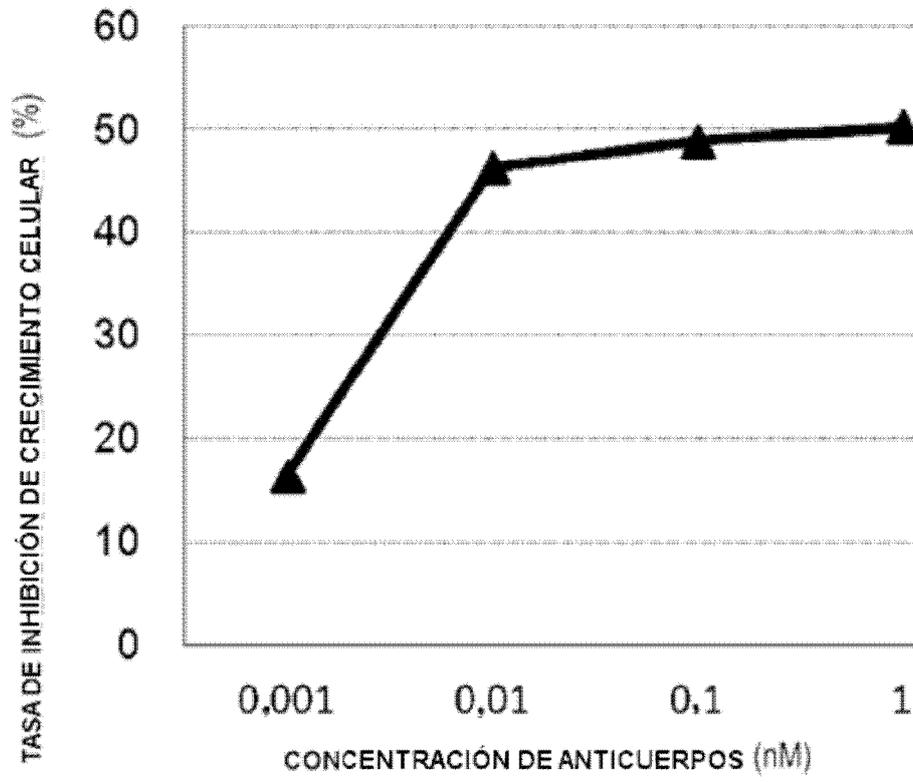


FIG. 26