

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 712**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2012 PCT/JP2012/078103**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13065708**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2012 E 12846665 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2787078**

54 Título: **Molécula de unión a antígeno que tiene una conjugación regulada entre la cadena pesada y la cadena ligera**

30 Prioridad:

31.10.2011 JP 2011238873

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

25.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KURAMOCHI, TAICHI;
KAWAZOE, MEIRI;
HIRONIWA, NAOKA y
IGAWA, TOMOYUKI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 732 712 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

Molécula de unión a antígeno que tiene una conjugación regulada entre la cadena pesada y la cadena ligera

5 Técnica antecedente

La presente invención se refiere a anticuerpos con una asociación regulada de la cadena pesada y la cadena ligera, a métodos para la producción de un anticuerpo con una asociación regulada de la cadena pesada y la cadena ligera, a métodos para la regulación de la asociación de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo, a composiciones farmacéuticas que comprenden al anticuerpo como principio activo, y similares.

Campo técnico

Se han descrito previamente varios métodos como métodos para preparar anticuerpos biespecíficos de tipo IgG que tienen regiones constantes humanas (anticuerpos de tipo IgG que tienen una región constante humana que tiene especificidad de unión para un antígeno A en un brazo y especificidad de unión para un antígeno B en el otro brazo). En general, los anticuerpos biespecíficos de tipo IgG están compuestos por dos tipos de cadenas H (a saber, una cadena H para el antígeno A y una cadena H para el antígeno B) y dos tipos de cadenas L (a saber, una cadena L para el antígeno A y una cadena L para antígeno B). Cuando se expresan tales anticuerpos biespecíficos de tipo IgG, son posibles 10 tipos de combinaciones como combinaciones de H2L2, dado que se expresan dos tipos de cadenas H y dos tipos de cadenas L. Entre estas, hay un tipo de combinación que tiene la especificidad de unión deseada (la IgG que tiene especificidad de unión para el antígeno A en un brazo y especificidad de unión para el antígeno B en el otro brazo). Como consecuencia, para adquirir el anticuerpo biespecífico deseado, es necesario purificar un tipo de anticuerpo de interés de entre diez tipos de anticuerpos, lo que es difícil y de una eficacia extremadamente baja.

Se han descrito métodos para resolver este problema, los cuales implican preferentemente la secreción de una IgG que tiene una combinación heteróloga de una cadena H para el antígeno A y una cadena H para el antígeno B, mediante la sustitución de aminoácidos en la región CH3 de la cadena H de la IgG (documentos de patente 1, 2, 3 y 4, y documentos no de patente 1 y 2). Entre estos, se han descrito métodos que usan obstáculos físicos en forma de "botón" y "ojal", y los que usan la repulsión de cargas eléctricas.

También se ha descrito un método para obtener de manera eficaz una molécula deseada, que utiliza una cadena L común, en la que están presentes en una misma secuencia de aminoácidos una cadena L para el antígeno A y una cadena L para el antígeno B (documentos de patente 5 y 6). Sin embargo, dado que el uso de una cadena L común tiene el potencial de reducir considerablemente la afinidad por el antígeno, este no es necesariamente el método óptimo. Como consecuencia, para que un anticuerpo biespecífico se una a dos antígenos con alta afinidad, es preferible que solo se asocien la cadena L y la cadena H para el antígeno A, y solo la cadena L y la cadena H para el antígeno B. Además, se ha descrito un método para permitir que las cadenas H y las cadenas L para cada antígeno se asocien con independencia de las regiones variables, lo que comprende sustituir aminoácidos en los dominios CH1 y CL, que son regiones constantes, en lugar de los de las regiones variables (documentos de patente 2 y 7). Sin embargo, este método es aún insuficiente para producir de forma eficaz un anticuerpo biespecífico de interés. Los documentos de patente 8 y 9 se refieren a un método de modificación de anticuerpos para purificar anticuerpos biespecíficos y a métodos para producir polipéptidos mediante la regulación de la asociación de polipéptidos, respectivamente, mientras que el documento no de patente 3 describe la estructura covalente de una molécula de inmunoglobulina gamma G completa.

[Documentos de la técnica anterior]

50 [Documentos de patente]

[Documento de patente 1] WO 96/27011
 [Documento de patente 2] WO 2006/106905
 [Documento de patente 3] WO 2009/089004
 [Documento de patente 4] WO 2010/129304
 [Documento de patente 5] WO 98/050431
 [Documento de patente 6] WO 2006/109592
 [Documento de patente 7] WO 2007/147901
 [Documento de patente 8] EP 2009101
 [Documento de patente 9] EP 1870459

[Documentos no de patente]

[Documento no de patente 1] Ridgway JB *et al.*, Protein Engineering, 1996, Vol. 9, pág. 617-621
 [Documento no de patente 2] Merchant AM *et al.*, Nature Biotechnology, 1998, Vol. 16, pág. 677-681
 [Documento no de patente 3] Edelman GM *et al.*, PNAS Sci USA, 1969, Vol. 63, pág. 78-85

Sumario de la invención

[Problemas a resolver por la invención]

5 La presente invención se ha logrado en tales circunstancias. Un objetivo de la presente invención es proporcionar anticuerpos en los que la asociación de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras está regulada, un método de producción de anticuerpos en los que la asociación de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras está regulada, y un método para la regulación de la asociación de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de un anticuerpo. Además, en una realización de la presente invención, un objetivo de la presente invención es proporcionar anticuerpos biespecíficos en los que la asociación en la interfaz de CH1 y CL esté regulada, y un método para producir de forma eficaz un anticuerpo biespecífico regulando la asociación en la interfaz de CH1 y CL.

[Medios de resolución de los problemas]

15 Los inventores de la presente invención seleccionaron una región constante de la cadena pesada, CH1, y una región constante de la cadena ligera (CL) como regiones de cadena pesada y de cadena ligera a utilizar para regular la asociación, y realizaron estudios destinados a la regulación de la asociación de CH1 y CL. Como resultado, los presentes inventores descubrieron que la asociación de CH1 y CL se puede suprimir sustituyendo los restos de aminoácidos presentes en la interfaz de CH1 y CL por restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca o restos de aminoácidos que no se repelen, y que las moléculas heterólogas se forman de forma más eficaz que usando modificaciones que solo introducen un "botón" y un "ojal" en CH3 como se ha descrito anteriormente.

20 Por lo tanto, de acuerdo con los hallazgos realizados por los presentes inventores, es posible regular la asociación de CH1 y CL. Además, la presente divulgación puede aplicarse no solo a la regulación de la asociación entre CH1 y CL, sino también a la regulación de la asociación entre polipéptidos arbitrarios.

25 Además, los presentes inventores también confirmaron que un anticuerpo biespecífico de la presente invención con una asociación regulada de la cadena pesada y la cadena ligera conserva de hecho la función.

30 Como se ha descrito anteriormente, los presentes inventores desarrollaron de forma satisfactoria moléculas de unión a antígeno en las que la asociación de la cadena pesada y la cadena ligera está regulada, y de este modo se consume la presente invención.

35 La presente invención se refiere a moléculas de unión a antígeno en las que la asociación de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras está regulada, a métodos de producción de una molécula de unión a antígeno en las que la asociación de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras está regulada, y a métodos para regular la asociación de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de una molécula de unión a antígeno como se define en las reivindicaciones.

40 Específicamente, la presente invención se refiere a lo siguiente:

45 [1] Un anticuerpo IgG biespecífico que comprende dos tipos de regiones constantes de la cadena pesada CH1, CH1-A y CH1-B, y dos tipos de regiones constantes de la cadena ligera CL, CL-A y CL-B, en el que la asociación de la cadena pesada y la cadena ligera está regulada de modo que se inhibe la asociación de CH1-A y CL-B y/o la asociación de CH1-B y CL-A, en donde

50 un conjunto o dos o más conjuntos de restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos mostrados en (a) a (c) a continuación en la cadena pesada y la cadena ligera en el anticuerpo biespecífico son restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca:

(a) el resto de aminoácido comprendido en la región constante de la cadena pesada (CHI) en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en la región constante de la cadena ligera (CL) en la posición 180 como se indica mediante la numeración de EU;

55 (b) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 131 como se indica mediante la numeración de EU; y,

60 (c) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 175 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 160 como se indica mediante la numeración de EU,

65 en donde los restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca se seleccionan de los restos de aminoácidos comprendidos en cualquiera de los conjuntos (X) e (Y) a continuación:

(X) ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D); e

(Y) lisina (K), arginina (R) o histidina (H).

5 [2] El anticuerpo biespecífico de [1],

A) en donde, adicionalmente, los restos de aminoácidos en el conjunto de restos de aminoácidos mostrados en (d) a continuación son restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca:

10 (d) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 213 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 123 como se indica mediante la numeración de EU; y/o

15 B) en donde, adicionalmente, dos o más restos de aminoácidos que forman una interfaz entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera son restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca, en particular

20 B1) en donde los restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca son un conjunto o dos conjuntos de restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos mostrados en (a) o (b):

(a) el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena pesada en la posición 39 como se indica mediante la numeración de Kabat y el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena ligera en la posición 38 como se indica mediante la numeración de Kabat; o

25 (b) el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena pesada en la posición 45 como se indica mediante la numeración de Kabat, y el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena ligera en la posición 44 como se indica mediante la numeración de Kabat,

30 y/o

B2) en donde los restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca se seleccionan de los restos de aminoácidos comprendidos en cualquiera de los conjuntos (X) e (Y) a continuación:

35 (X) ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D); e

(Y) lisina (K), arginina (R) o histidina (H).

40 [3] Un método de producción de un anticuerpo IgG biespecífico que comprende dos tipos de regiones constantes de la cadena pesada CH1, CH1-A y CH1-B, y dos tipos de regiones constantes de la cadena ligera CL, CL-A y CL-B, en el que la asociación de la cadena pesada y la cadena ligera está regulada de modo que se inhibe la asociación de CH1-A y CL-B y/o la asociación de CH1-B y CL-A, en donde el método comprende las etapas de (1) a (3) a continuación:

45 (1) modificación de los ácidos nucleicos que codifican la región constante de la cadena pesada (CH1) y la región constante de la cadena ligera (CL), de modo que un conjunto o dos o más conjuntos de restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos mostrados en (a) a (c) a continuación se repelen eléctricamente de forma recíproca:

50 (a) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 180 como se indica mediante la numeración de EU;

55 (b) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 131 como se indica mediante la numeración de EU; y,

60 (c) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 175 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 160 como se indica mediante la numeración de EU,

en donde

los restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca se seleccionan de entre los restos de aminoácidos comprendidos en cualquiera de los conjuntos (X) e (Y) a continuación:

65 (X) ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D); y

(Y) lisina (K), arginina (R) o histidina (H);

(2) introducción de los ácidos nucleicos modificados en una célula hospedadora y el cultivo de la célula hospedadora de modo que exprese los ácidos nucleicos, y

(3) recogida del anticuerpo biespecífico de un cultivo de la célula hospedadora.

[4] El método de producción de un anticuerpo biespecífico de [3],

A) que comprende adicionalmente en la etapa (1), la modificación de los ácidos nucleicos de modo que los restos de aminoácidos en el conjunto de restos de aminoácidos mostrados en (d) a continuación se repelen eléctricamente entre sí:

(d) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 213 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 123 como se indica mediante la numeración de EU;
y/o

B) que comprende adicionalmente en la etapa (1) la modificación de los ácidos nucleicos de modo que dos o más restos de aminoácidos que forman la interfaz entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera sean restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca,

en particular

B1) en donde los restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca son restos de aminoácidos de uno cualquiera de los conjuntos seleccionados del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos mostrados en (a) o (b) a continuación:

(a) el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena pesada en la posición 39 como se indica mediante la numeración de Kabat, y el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena ligera en la posición 38 como se indica mediante la numeración de Kabat; o

(b) el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena pesada en la posición 45 como se indica mediante la numeración de Kabat, y el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena ligera en la posición 44 como se indica mediante la numeración de Kabat.

y/o

B2) en donde los restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca se seleccionan de restos de aminoácidos comprendidos en cualquiera de los conjuntos (X) e (Y) a continuación:

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

[5] Un método para regular la asociación de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo IgG biespecífico que comprende dos tipos de regiones constantes de la cadena pesada CH1, CH1-A y CH1-B, y dos tipos de regiones constantes de la cadena ligera CL, CL-A y CL-B, de modo que se inhibe la asociación de CH1-A y CL-B y/o la asociación de CH1-B y CL-A, en donde el método comprende:

la modificación de los ácidos nucleicos de modo que un conjunto o dos o más conjuntos de restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos mostrados en (a) a (c) a continuación sean restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca:

(a) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 180 como se indica mediante la numeración de EU;

(b) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 131 como se indica mediante la numeración de EU; y

(c) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 175 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 160 como se indica mediante la numeración de EU, en donde los restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca se seleccionan de restos de aminoácidos comprendidos en cualquiera de los conjuntos (X) e (Y) a continuación:

(X) ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D); e

(Y) lisina (K), arginina (R) o histidina (H).

[6] El método de [5],

A) que comprende adicionalmente la modificación de los ácidos nucleicos de modo que los restos de aminoácidos en el conjunto de restos de aminoácidos mostrados en (d) a continuación sean restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca:

5 (d) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 213 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 123 como se indica mediante la numeración de EU;
y/o

10 B) en donde, adicionalmente, dos o más restos de aminoácidos que forman la interfaz entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera son restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca,

en particular

15 B1) en donde los restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca son restos de aminoácidos de uno cualquiera de los conjuntos seleccionados del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos mostrados en (a) o (b) a continuación:

20 (a) el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena pesada en la posición 39 como se indica mediante la numeración de Kabat, y el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena ligera en la posición 38 como se indica mediante la numeración de Kabat; o

(b) el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena pesada en la posición 45 como se indica mediante la numeración de Kabat, y el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena ligera en la posición 44 como se indica mediante la numeración de Kabat,

25 y/o

B2) en donde los restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca se seleccionan de restos de aminoácidos comprendidos en cualquiera de los conjuntos (X) e (Y) a continuación:

30 (X) ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D); e

(Y) lisina (K), arginina (R) o histidina (H).

35 [7] Una composición que contiene el anticuerpo biespecífico de uno cualquiera de [1] y [2], y un transportador farmacéuticamente aceptable.

[8] Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo biespecífico de uno cualquiera de [1] y [2].

40 [9] Una célula hospedadora que tiene el ácido nucleico de [8].

Breve descripción de los dibujos

45 La Fig. 1 es un diagrama de modelo de una interfaz de CH1/CL.

La Fig. 2 es un anticuerpo conceptual que muestra posibles combinaciones de cadena H y cadena L cuando el anticuerpo se prepara mezclando un tipo de cadena H y dos tipos de cadenas L.

Se cree que los sitios mutados que proporcionaron una gran proporción del anticuerpo con la combinación de E y K, como se muestra en el recuadro, interactúan eléctricamente.

50 La Fig. 3 representa gráficas que muestran los resultados del análisis por AIEX de cada uno de los anticuerpos.

La Fig. 4 representa gráficas que muestran los resultados del análisis por AIEX de cada uno de los anticuerpos.

La Fig. 5 representa gráficas que muestran los resultados del análisis por AIEX de cada uno de los anticuerpos.

La Fig. 6 representa una gráfica que muestra los resultados del análisis por AIEX de cada uno de los anticuerpos.

55 La Fig. 7 representa gráficas que muestran los resultados del análisis por CIEX de cada uno de los anticuerpos.

La Fig. 8 representa gráficas que muestran los resultados del análisis por CIEX de cada uno de los anticuerpos.

La Fig. 9-1 representa gráficas que muestran los resultados del análisis por CIEX de cada uno de los anticuerpos.

La Fig. 9-2 es una continuación de la figura 9-1.

60 La Fig. 10 representa gráficas que muestran los resultados del análisis por CIEX de cada uno de los anticuerpos.

La Fig. 11 representa gráficas que muestran los resultados del análisis por CIEX de cada uno de los anticuerpos.

65 La Fig. 12 es un diagrama que compara el CH1 de la cadena H alineando las secuencias de aminoácidos de la IgA1 humana (SEQ ID NO: 63), IgA2 (SEQ ID NO: 64), IgD (SEQ ID NO: 65), IgE (SEQ ID NO: 66), IgG1 (SEQ ID NO: 67), IgG2 (SEQ ID NO: 68), IgG3 (SEQ ID NO: 69), IgG4 (SEQ ID NO: 70) e IgM (SEQ ID NO: 71); y el CL de la cadena L alineando las secuencias de aminoácidos de la IgK humana (Kappa) (SEQ ID NO: 72), IgL1 (SEQ ID NO: 73), IgL2 (SEQ ID NO: 74), IgL3 (SEQ ID NO: 75), IgL6 (SEQ ID NO: 76), IgL7 (SEQ ID NO: 77) (Lambda).

[Modo de llevar a cabo la invención]

La presente invención se refiere a anticuerpos en los que la asociación de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras está regulada, a métodos de producción de un anticuerpo en que la asociación de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras está regulada, y a métodos para la regulación de la asociación de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de un anticuerpo, como se define en las reivindicaciones.

El término "anticuerpo" se utiliza como sinónimo de "molécula de unión a antígeno". Es decir, el término "anticuerpo" y la expresión "molécula de unión a antígeno" se usan en el sentido más amplio, e incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y variantes de anticuerpos (tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de bajo peso molecular (incluidos fragmentos de anticuerpos a los que se pueden añadir otras moléculas de forma arbitraria), y anticuerpos poliespecíficos) siempre que demuestren la actividad de unión a antígeno o actividad biológica deseada. Un ejemplo de un "anticuerpo" o "molécula de unión a antígeno" en la presente invención es una molécula en la que se ha añadido un armazón de unión a HAS al Fab (un anticuerpo en el que solo la porción de Fab es normal). Además, en la presente invención, el "anticuerpo" también puede ser un polipéptido o un multímero heteromérico. Los anticuerpos preferentes son anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos de fusión con el Fc y anticuerpos de bajo peso molecular tales como fragmentos de anticuerpos.

El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo IgG biespecífico como se define en las reivindicaciones, en el que la asociación de la cadena pesada y la cadena ligera está regulada, en el que la cadena pesada y la cadena ligera que constituyen el anticuerpo son una combinación de una cadena pesada y una cadena ligera de interés, y en el que los restos de aminoácidos en ubicaciones determinadas en la región constante de la cadena pesada (CHI) y en la región constante de la cadena ligera son restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca (que tienen la misma carga).

En la presente invención, haciendo que restos de aminoácidos en ubicaciones determinadas en la región constante de la cadena pesada (CHI) y región constante de la cadena ligera de una combinación no deseada de cadena pesada y cadena ligera se vuelvan restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca (es decir, que tienen la misma carga), se puede impedir la formación de combinaciones no deseadas de cadena pesada y cadena ligera utilizando esta repulsión de carga y, como resultado, se puede formar la combinación deseada de cadena pesada y cadena ligera.

El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo en el que la asociación de la cadena pesada y la ligera está regulada, en el que la cadena pesada y la cadena ligera que constituyen el anticuerpo se asocian como una combinación de una cadena pesada y una cadena ligera de interés, y en el que los restos de aminoácidos en ubicaciones determinadas en la región constante de la cadena pesada (CHI) y en la región constante de la cadena ligera no se repelen eléctricamente de forma recíproca. Haciendo que restos de aminoácidos en ubicaciones determinadas en la región constante de la cadena pesada (CHI) y la región constante de la cadena ligera de una combinación deseada de cadena pesada y cadena ligera se vuelvan restos de aminoácidos que no se repelen eléctricamente de forma recíproca, se puede formar una combinación deseada de cadena pesada y cadena ligera, por ejemplo, utilizando la fuerza de atracción de las cargas eléctricas.

El término "polipéptido" se refiere, generalmente, a péptidos y proteínas cuya longitud es de aproximadamente diez aminoácidos o más. Los polipéptidos proceden, habitualmente, de organismos, pero no están particularmente limitados a ellos, y por ejemplo, pueden estar compuestos de una secuencia diseñada artificialmente. Además, pueden ser cualquiera de polipéptidos de origen natural, polipéptidos sintéticos, polipéptidos recombinantes, o similares. Adicionalmente, también están incluidos en los polipéptidos del presente documento fragmentos de los polipéptidos mencionados anteriormente.

Las frases "para regular la asociación" y "la asociación está regulada" se refieren a la regulación para lograr una condición de asociación deseada, y más específicamente se refiere a la regulación para que no se formen asociaciones no deseadas entre la cadena pesada y la cadena ligera.

El término "interfaz" generalmente se refiere a la superficie de asociación que es el resultado de la asociación (interacción), y los restos de aminoácidos que forman la interfaz son habitualmente uno o más restos de aminoácidos incluidos en las regiones polipeptídicas que participan en la asociación, y son, más preferentemente, de aminoácidos que se aproximan entre sí durante la asociación y están implicados en la interacción. De manera más específica, esta interacción incluye, por ejemplo, instancias donde los restos de aminoácidos se acercan durante la asociación para formar enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas o puentes salinos entre sí.

La frase, "restos de aminoácidos que forman una interfaz" se refiere más específicamente a restos de aminoácidos incluidos en la región polipeptídica que constituye la interfaz. Por ejemplo, regiones polipeptídicas que constituyen la interfaz se refiere a las regiones polipeptídicas responsables de la unión selectiva entre moléculas, tal como en los anticuerpos, ligandos, receptores o sustratos. De manera más específica, en los anticuerpos, tales ejemplos incluyen regiones constantes de la cadena pesada, regiones variables de la cadena pesada, regiones constantes de la

cadena ligera y regiones variables de la cadena ligera.

"Modificación" de restos de aminoácidos se refiere específicamente a la sustitución de un resto (o restos) de aminoácido original por otro resto (o restos) de aminoácido, a suprimir un resto (o restos) de aminoácido original, a añadir un resto (o restos) de aminoácido nuevo, y demás, pero preferentemente se refiere a sustituir uno o más restos de aminoácidos originales por otros restos de aminoácidos.

El anticuerpo puede tener restos de aminoácidos en ubicaciones determinadas en la región constante de la cadena pesada (CH1) y la región constante de la cadena ligera de una combinación no deseada de cadena pesada y cadena ligera antes de la regulación de la asociación que repele eléctricamente (que tienen la misma carga).

Al modificar los restos de aminoácidos en el anticuerpo mencionado anteriormente para dar lugar a restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca (tienen la misma carga), se cree que la asociación de estos restos de aminoácidos se inhibe por la fuerza repulsiva de las cargas eléctricas.

El anticuerpo puede tener restos de aminoácidos implicados en la asociación en la interfaz de los polipéptidos que no se repelen eléctricamente de forma recíproca.

En el anticuerpo mencionado anteriormente, al modificar los restos de aminoácidos implicados en la asociación en la interfaz de los polipéptidos para dar lugar a restos de aminoácidos que no se repelen eléctricamente de forma recíproca, se cree que la asociación de estos restos de aminoácidos es estimulada, por ejemplo, por la fuerza de atracción de sus cargas eléctricas.

Por lo tanto, en el anticuerpo mencionado anteriormente, los restos de aminoácidos modificados son preferentemente restos de aminoácidos que se aproximan entre sí en la asociación, en las regiones polipeptídicas que forman la interfaz.

Los restos de aminoácidos que se aproximan durante la asociación pueden determinarse, por ejemplo, analizando la estructura tridimensional de un polipéptido, e investigando las secuencias de aminoácidos de las regiones polipeptídicas que forman una interfaz durante la asociación de polipéptidos. Los restos de aminoácidos en la interfaz que se aproximan entre sí de forma recíproca son dianas preferentes de "modificación" en el anticuerpo de la presente invención.

Se sabe que algunos aminoácidos están cargados eléctricamente. En general, se sabe que la lisina (K), la arginina (R) y la histidina (H) son aminoácidos que tienen una carga positiva (aminoácidos cargados positivamente). Se sabe que el ácido aspártico (D), el ácido glutámico (E) y demás, son aminoácidos que tienen una carga negativa (aminoácidos cargados negativamente). Además, se sabe que la alanina (A), asparagina (N), cisteína (C), glutamina (Q), glicina (G), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), fenilalanina (F), prolina (P), serina (S), treonina (T), triptófano (W), tirosina (Y), valina (V) y similares son aminoácidos que no tienen carga o aminoácidos no polares.

Por lo tanto, los aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca (tienen la misma carga) en la presente invención se refiere a:

- (1) aminoácidos en los que uno de los aminoácidos es un aminoácido cargado positivamente y el otro aminoácido también es un aminoácido cargado positivamente, y
- (2) aminoácidos en los que uno de los aminoácidos es un aminoácido cargado negativamente y el otro aminoácido también es un aminoácido cargado negativamente.

Adicionalmente, los aminoácidos que no se repelen eléctricamente de forma recíproca en la presente invención se refiere a:

- (1) aminoácidos en los que uno de los aminoácidos es un aminoácido cargado positivamente y el otro aminoácido es un aminoácido cargado negativamente,
- (2) aminoácidos en los que uno de los aminoácidos es un aminoácido cargado positivamente y el otro aminoácido es un aminoácido no cargado o un aminoácido no polar,
- (3) aminoácidos en los que uno de los aminoácidos es un aminoácido cargado negativamente y el otro aminoácido es un aminoácido no cargado o un aminoácido no polar, y
- (4) aminoácidos en los que ambos aminoácidos son aminoácidos no cargados o aminoácidos no polares.

Los aminoácidos pueden modificarse de acuerdo con diversos métodos conocidos en el campo de la técnica. Los ejemplos de estos métodos incluyen, pero sin limitación, mutagénesis dirigida (Hashimoto-Gotoh, T., Mizuno, T., Ogasahara, Y. y Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis, *Gene* 152, 271-275; Zoller, M.J. y Smith, M. (1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors, *Methods Enzymol.* 100, 468-500; Kramer, W., Drutsa, V., Jansen, H.W., Kramer, B., Pflugfelder, M. y Fritz, H.J. (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456; Kramer, W. y Fritz, H.J. (1987) Oligonucleotide-directed construction

of mutations via gapped duplex DNA, *Methods Enzymol.* 154, 350-367; Kunkel, T.A. (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 488-492), mutagénesis por PCR, mutagénesis de casete, etc.

5 Los ejemplos de modificaciones de aminoácidos incluyen la modificación de un aminoácido no cargado o un aminoácido no polar para dar un aminoácido cargado positivamente, la modificación de un aminoácido no cargado o un aminoácido no polar para dar un aminoácido cargado negativamente, la modificación de un aminoácido cargado positivamente para dar un aminoácido cargado negativamente y la modificación de un aminoácido cargado negativamente para dar un aminoácido cargado positivamente. Adicionalmente, la modificación de un aminoácido no cargado o un aminoácido no polar para dar un aminoácido no cargado o no polar distinto, la modificación de un aminoácido cargado positivamente para dar un aminoácido cargado positivamente distinto, y la modificación de un aminoácido cargado negativamente para dar un aminoácido cargado negativamente distinto, también se incluyen en las modificaciones de aminoácidos en el contexto de la presente invención.

15 La modificación de aminoácidos en la presente invención incluye realizar una modificación en cada una de las cadenas pesada y ligera, o realizar múltiples modificaciones en cada una de las cadenas pesada y ligera. Además, el número de modificaciones añadidas a la cadena pesada y ligera puede ser igual o distinto.

20 La modificación de aminoácidos en la presente invención incluye hacer múltiples modificaciones en aminoácidos cargados positivamente en la cadena pesada o la cadena ligera, y hacer múltiples modificaciones en aminoácidos cargados negativamente en la otra cadena. Además, se pueden hacer múltiples modificaciones en aminoácidos cargados positivamente, así como múltiples modificaciones en aminoácidos cargados negativamente, en la misma cadena pesada o cadena ligera. En estas modificaciones, las modificaciones en aminoácidos no cargados o aminoácidos no polares, así como las modificaciones de aminoácidos no cargados o aminoácidos no polares también pueden combinarse adecuadamente.

25 En las modificaciones en el contexto de la presente invención, por ejemplo, los aminoácidos en una de las cadenas se pueden utilizar como están, sin modificarse y, en tales casos, no se necesita modificar la cadena pesada y la cadena ligera, y puede modificarse solo una de las cadenas.

30 Aunque no hay limitaciones particulares en cuanto al número de restos de aminoácidos sometidos a modificación en el anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, cuando se modifica la región constante del anticuerpo, para no reducir la actividad de unión hacia el antígeno y no aumentar la inmunogenicidad, es preferente modificar la menor cantidad posible de restos de aminoácidos. El "pocos" mencionado anteriormente se refiere a, por ejemplo, un número de aproximadamente de 1 a 30, preferentemente un número de aproximadamente de 1 a 20, incluso más preferentemente un número de aproximadamente de 1 a 15, y muy preferentemente un número de 1 a 5.

35 El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo IgG biespecífico. El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio, e incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, variantes de anticuerpos (tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de bajo peso molecular (incluidos fragmentos de anticuerpos) y anticuerpos poliespecíficos) siempre que demuestren la actividad biológica deseada. Además, el "anticuerpo" en el presente documento puede ser un polipéptido o un multímero heteromérico. Los anticuerpos preferentes son anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos de fusión con el Fc y anticuerpos de bajo peso molecular tales como fragmentos de anticuerpos.

40 En el contexto de la presente invención, la expresión "anticuerpo multiespecífico" (usada en la presente descripción para tener el mismo significado que "anticuerpo poliespecífico") se refiere a un anticuerpo que puede unirse específicamente a distintos tipos de epítomos. De manera más específica, los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos que tienen especificidad por al menos dos tipos distintos de epítomos y, además de los anticuerpos que reconocen distintos antígenos, también están incluidos los anticuerpos que reconocen distintos epítomos en el mismo antígeno. (Por ejemplo, cuando los antígenos son receptores heterólogos, los anticuerpos multiespecíficos pueden reconocer distintos dominios que constituyen los receptores heterólogos; como alternativa, cuando los antígenos son monómeros, los anticuerpos multiespecíficos reconocen múltiples sitios en los antígenos monoméricos).

55 Habitualmente, tales moléculas se unen a dos antígenos (anticuerpos biespecíficos; utilizado en la presente descripción con el mismo significado que "anticuerpos doble específicos"), pero incluso pueden tener especificidad para más antígenos (por ejemplo, tres tipos).

60 Además de los anticuerpos descritos anteriormente, los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos cuyas secuencias de aminoácidos han sido modificadas por sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos, o quimerización, humanización, y demás. Dichas modificaciones de la secuencia de aminoácidos, tales como sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos, y humanización y quimerización, puede lograrse mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Cuando los anticuerpos de la presente invención se preparan como anticuerpos recombinantes, de manera similar, las secuencias de aminoácidos de las regiones variable y constante del anticuerpo también pueden modificarse mediante sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos, o quimerización, humanización y similar.

Los anticuerpos de la presente invención pueden obtenerse de cualquier animal, tal como un ratón, ser humano, rata, conejo, cabra o camello. Adicionalmente, los anticuerpos pueden ser modificados, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, y en particular, anticuerpos modificados que incluyen sustituciones de aminoácidos en su secuencia, tales como anticuerpos humanizados. Los anticuerpos pueden ser cualquier tipo de anticuerpo, tal como productos de modificación de anticuerpos unidos a diversas moléculas, fragmentos de anticuerpos y anticuerpos de bajo peso molecular.

Los "anticuerpos quiméricos" son anticuerpos preparados combinando secuencias procedentes de distintos animales. Un ejemplo es un anticuerpo que tiene regiones variables (V) de la cadena pesada y la ligera de un anticuerpo de ratón y regiones constantes (C) de la cadena pesada y la ligera de un anticuerpo humano. Los anticuerpos quiméricos se pueden preparar por métodos conocidos. Para obtener tales anticuerpos quiméricos, por ejemplo, puede ligarse un ADN que codifica una región V de anticuerpo con un ADN que codifica una región constante de anticuerpo humano; el producto de ligación resultante puede insertarse en un vector de expresión; y la construcción puede introducirse en un hospedador para producir el anticuerpo quimérico.

Los "anticuerpos humanizados" también se denominan anticuerpos humanos remodelados, y pueden obtenerse sustituyendo la región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo humano por la (CDR) de un anticuerpo de un mamífero no humano, por ejemplo, un ratón. Los métodos para identificar las CDR son conocidos en la técnica (Kabat *et al.*, Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia *et al.*, Nature (1989) 342:877). También se conocen técnicas generales de recombinación genética adecuadas para este fin (véase la publicación de solicitud de patente europea n.º EP 125023; y el documento WO 96/02576). Por ejemplo, la CDR de un anticuerpo de ratón se puede determinar por métodos conocidos, y se puede preparar un ADN de tal manera que codifique un anticuerpo en el que la CDR está ligada con la región marco conservada (FR) de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado puede producirse entonces utilizando un sistema que use vectores de expresión convencionales. Dichos ADN se pueden sintetizar por PCR, utilizando como cebadores varios oligonucleótidos diseñados para incluir porciones que se solapan con los extremos de las regiones CDR y FR (véase el método descrito en el documento WO 98/13388). Los FR de anticuerpos humanos unidos a través de CDR se seleccionan de manera que las CDR formen un sitio de unión a antígeno adecuado. Si es necesario, los aminoácidos en las FR de una región variable de anticuerpo pueden modificarse de modo que las CDR del anticuerpo humano remodelado puedan formar un sitio de unión a antígeno adecuado (Sato, K. *et al.*, Cancer Res. (1993) 53:851-856). Los restos de aminoácidos modificables en las FR incluyen porciones que se unen directamente a un antígeno a través de enlaces no covalentes (Amit *et al.*, Science (1986) 233: 747-53), porciones que tienen algún impacto o efecto en la estructura de la CDR (Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. (1987) 196: 901-17), y porciones implicadas en la interacción entre VH y VL (documento EP 239400).

La región constante de la cadena pesada del anticuerpo de la presente invención es, preferentemente, una región constante de la cadena pesada humana. Además, los ejemplos de regiones constantes de la cadena pesada de anticuerpos incluyen regiones constantes de tipo IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y IgM. La región constante de la cadena pesada del anticuerpo de la presente invención es, preferentemente, una región constante de tipo IgG1, y en particular, preferentemente, una región constante de IgG1 humana, pero no se limita a las mismas. Varias secuencias de alotipos obtenidas por polimorfismo genético se describen en Secuencias de proteínas de interés inmunológico, publicación NIH N.º 91-3242, como región constante de IgG1 humana, y en la presente invención puede usarse cualquiera de estas.

Además, la región constante de la cadena ligera del anticuerpo de la presente invención es, preferentemente, una región constante de la cadena ligera humana. Los ejemplos de región constante de la cadena ligera del anticuerpo incluyen regiones constantes de tipo IgK (Kappa), IgL1, IgL2, IgL3, IgL6 e IgL7 (Lambda). La región constante de la cadena ligera del anticuerpo de la presente invención es, preferentemente, una región constante de la IgK (Kappa) humana, pero sin limitación a la misma. La secuencia de aminoácidos de la región constante de IgK (Kappa) humana es conocida (SEC ID NO: 72). Varias secuencias de alotipos obtenidas por polimorfismo genético se describen en Secuencias de proteínas de interés inmunológico, publicación NIH N.º 91-3242, como región constante de IgK (Kappa) humana y región constante de IgL7 (Lambda) humana, y en la presente invención puede usarse cualquiera de estas.

Las regiones constantes de anticuerpos, en particular, las regiones constantes de la cadena pesada, puede modificarse según sea necesario para mejorar la función del anticuerpo o la estabilidad del anticuerpo. Los ejemplos de modificaciones para mejorar la función del anticuerpo incluyen modificaciones que fortalecen o debilitan la unión entre un anticuerpo y un receptor Fcγ (FcγR), modificaciones que fortalecen o debilitan la unión entre un anticuerpo y el FcRn, modificaciones que fortalecen o debilitan la actividad citotóxica del anticuerpo (tal como la actividad ADCC y la actividad de la CDC), y similares. Además, también se pueden incluir modificaciones que mejoran la heterogeneidad de los anticuerpos y modificaciones que mejoran la inmunogenicidad y/o la farmacocinética.

Además, como la heterogeneidad de la secuencia C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo IgG, se ha informado sobre la amidación del grupo carboxilo C-terminal mediante la delección del aminoácido C-terminal, un resto de lisina, o por delección de los dos aminoácidos C-terminales, glicina y lisina (Anal. Biochem. 1 de enero de 2007:360(1):75-83). Por lo tanto, en la presente invención, para disminuir la heterogeneidad del extremo C de la cadena pesada C, es preferible utilizar una IgG en la que se hayan eliminado la lisina C-terminal o la lisina y glicina C-terminales.

Dado que su antigenicidad en el cuerpo humano se ha atenuado, se espera que los anticuerpos quiméricos y humanizados que utilizan secuencias procedentes de humano sean útiles cuando se administran a seres humanos con fines terapéuticos o similares.

Además, los anticuerpos de bajo peso molecular son útiles como anticuerpos debido a sus características cinéticas *en vivo* y a la producción de bajo costo utilizando *E. coli*, células vegetales, o similares.

Los fragmentos de anticuerpos son un tipo de anticuerpo de bajo peso molecular. La expresión "anticuerpo de bajo peso molecular" incluye anticuerpos que incluyen un fragmento de anticuerpo como una unidad estructural parcial. Los anticuerpos de bajo peso molecular de la presente invención no están particularmente limitados por su estructura ni por su método de producción, siempre y cuando tengan actividad de unión a antígeno. Algunos anticuerpos de bajo peso molecular tienen una actividad mayor que la de un anticuerpo completo (Orita *et al.*, Blood (2005) 105:562-566). En el presente documento, los "fragmentos de anticuerpos" no están particularmente limitados, siempre y cuando sean una porción de un anticuerpo completo (por ejemplo, IgG completa). Sin embargo, los fragmentos de anticuerpo incluyen preferentemente una región variable de cadena pesada (VH) o una región variable de cadena ligera (VL), e incluyen adicionalmente CH1 o CL. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos preferentes son: Fab, F(ab')₂ y Fab'. Las secuencias de aminoácidos de un VH, VL, CH1 y CL en un fragmento de anticuerpo pueden modificarse por sustitución, delección, adición y/o inserción. Adicionalmente, algunas porciones de un CH1, CL, VH y VL pueden eliminarse, siempre y cuando los fragmentos resultantes conserven su capacidad de unión al antígeno, y también pueden añadirse para aumentar la farmacocinética (PK) o la eficacia del fármaco fragmentos de anticuerpos tales como scFv, Fab, dominio de dominio (dAb) y VHH, armazón de unión a HAS, PEG, albúmina, citocinas, toxinas y similares (las moléculas descritas en Biodrugs, 2009, 23(2):93-109; Methods Mol. Med., 2005, 109:347-74; AAPS J., 18 de agosto de 2006, 8(3):E532-51; etc.).

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

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

Un ejemplo preferente del anticuerpo de la presente invención es un multímero heteromérico que tiene dos o más tipos de CH1 y dos o más tipos de CL. Este multímero heteromérico reconoce preferentemente dos o más tipos de epítomos, y un ejemplo del mismo es un anticuerpo poliespecífico.

Como ejemplo preferente de un anticuerpo poliespecífico, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo biespecífico. Por lo tanto, un ejemplo de una realización preferente del anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo biespecífico compuesto por dos tipos de cadenas pesadas (una primera cadena pesada y una segunda cadena pesada) y dos tipos de cadenas ligeras (una primera cadena ligera y una segunda cadena ligera).

Al describir los "anticuerpos biespecíficos" de las realizaciones preferentes de los anticuerpos de la presente invención de forma más precisa, la "primera cadena pesada" mencionada anteriormente se refiere a una de las dos cadenas pesadas (cadenas H) que forman el anticuerpo, y la "segunda cadena H" se refiere a la otra cadena H, que es distinta de la primera cadena H. Es decir, de las dos cadenas H, una de ellas puede definirse arbitrariamente como la primera cadena H y la otra puede definirse como la segunda cadena H. De forma similar, la "primera cadena ligera" se refiere a una de las dos cadenas ligeras (cadenas L) que forman el anticuerpo biespecífico, y la "segunda cadena L" se refiere a la otra cadena L, que es distinta de la primera cadena L. De las dos cadenas L, una de ellas puede definirse arbitrariamente como la primera cadena L y la otra puede definirse como la segunda cadena L. Habitualmente, la primera cadena L y la primera cadena H proceden de un mismo anticuerpo que reconoce un determinado antígeno (o epítomo), y la segunda cadena L y la segunda cadena H también proceden de un mismo anticuerpo que reconoce un determinado antígeno (o epítomo). En el presente documento, la pareja de cadena L-cadena H formada por la primera cadena H y la cadena L se llama primera pareja, y la pareja de cadena L-cadena H

formada por la segunda cadena H y la cadena L se llama segunda pareja. El antígeno (o epítipo) usado para producir el anticuerpo del que procede la segunda pareja es, preferentemente, distinto del antígeno usado para producir el anticuerpo del que procede la primera pareja. De manera más específica, los antígenos reconocidos por la primera pareja y la segunda pareja pueden ser los mismos, pero, preferentemente, las parejas reconocen antígenos (o epítipos) distintos. En este caso, las cadenas H y las cadenas L de la primera pareja y de la segunda pareja tienen preferentemente secuencias de aminoácidos que difieren entre sí. Cuando la primera pareja y la segunda pareja reconocen distintos epítipos, la primera pareja y la segunda pareja pueden reconocer un antígeno completamente distinto, o pueden reconocer distintos sitios (distintos epítipos) en el mismo antígeno. Adicionalmente, una de ellas puede reconocer un antígeno tal como una proteína, péptido, gen o azúcar, y la otra puede reconocer sustancias citotóxicas tales como sustancias radioactivas, agentes quimioterapéuticos o toxinas procedentes de células. Sin embargo, cuando se desea producir un anticuerpo que tenga parejas formadas por combinaciones específicas de cadenas H y cadenas L, estas cadenas H y cadenas L específicas pueden determinarse arbitrariamente como la primera pareja y la segunda pareja.

En cuanto a los genes que codifican la cadena H o la cadena L de anticuerpos antes de la introducción de mutaciones en la presente invención (en el presente documento, se puede referir simplemente como "un anticuerpo de la presente invención"), pueden usarse secuencias conocidas, o pueden obtenerse mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden obtenerse de una biblioteca de anticuerpos, o pueden obtenerse clonando genes que codifiquen el anticuerpo a partir de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales.

Con respecto a las bibliotecas de anticuerpos, muchas bibliotecas de anticuerpos son ya muy conocidas y, dado que se conocen los métodos para producir bibliotecas de anticuerpos, los expertos en la materia pueden obtener bibliotecas de anticuerpos de forma apropiada. Por ejemplo, con respecto a bibliotecas de fagos de anticuerpos, se puede hacer referencia a bibliografía tal como Clackson *et al.*, Nature 1991, 352: 624-8; Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 1991, 222: 581-97; Waterhouses *et al.*, Nucleic Acids Res. 1993, 21: 2265-6; Griffiths *et al.*, EMBO J. 1994, 13: 3245-60; Vaughan *et al.*, Nature Biotechnology 1996, 14: 309-14; y la patente japonesa Kohyo Publicación N.º (JPA) H10-504970 (publicación de fase nacional japonesa no examinada correspondiente a una publicación internacional no japonesa). Además, se pueden usar métodos conocidos, tales como los métodos que utilizan células eucariotas como bibliotecas (documento WO95/15393) y los métodos de presentación de ribosomas. Adicionalmente, también se conocen técnicas para obtener anticuerpos humanos mediante la selección usando bibliotecas de anticuerpos humanos. Por ejemplo, usando métodos de presentación en fagos pueden expresarse regiones variables de anticuerpos humanos en la superficie de fagos como anticuerpos monocatenarios (los scFv), y pueden seleccionarse los fagos que se unen a los antígenos. El análisis genético de los fagos seleccionados puede determinar las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de los anticuerpos humanos que se unen a los antígenos. Una vez que se revelan las secuencias de ADN de los scFv que se unen a los antígenos, se pueden producir vectores de expresión adecuados basándose en estas secuencias, para obtener los anticuerpos humanos. Estos métodos ya son muy conocidos y se puede referenciar al documento WO92/01047, WO92/20791, WO93/06213, WO93/11236, WO93/19172, WO95/01438 y WO95/15388.

En cuanto a los métodos para obtener genes que codifican anticuerpos a partir de hibridomas, básicamente se pueden utilizar técnicas conocidas, las cuales implican el uso de los antígenos deseados o células que expresan los antígenos deseados como antígenos sensibilizantes, usando estos para realizar inmunizaciones de acuerdo con métodos de inmunización convencionales, la fusión de las células inmunitarias así obtenidas con células parentales conocidas mediante métodos de fusión de células comunes, la exploración de las células productoras de anticuerpos monoclonales (hibridomas) por métodos de cribado comunes, la síntesis de ADNc de las regiones variables de anticuerpo (regiones V) a partir de los ARNm de los hibridomas obtenidos, usando transcriptasa inversa, y su unión a los ADN que codifican las regiones constantes de anticuerpo deseadas.

Los antígenos sensibilizantes para obtener los genes de anticuerpos mencionados anteriormente que codifican la cadena H y la cadena L no se limitan particularmente a los ejemplos descritos a continuación, pero incluyen antígenos completos que tienen inmunogenicidad y antígenos incompletos incluyendo haptenos y similares, que no muestran inmunogenicidad. No hay limitaciones particulares sobre el antígeno para los anticuerpos de la presente invención y se sabe que pueden usarse, por ejemplo, una proteína de longitud completa o un péptido parcial de una proteína diana, así como sustancias compuestas de polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y similares que se sabe que pueden servir como un antígeno. Los antígenos pueden prepararse en conformidad con métodos que son conocidos por los expertos en la materia, tales como los métodos que utilizan baculovirus (tales como los descritos en el documento WO 98/46777). Se pueden producir hibridomas, por ejemplo, siguiendo los métodos de Milstein *et al.* (G. Kohler y C. Milstein, Methods Enzymol. 1981, 73: 3-46), y similares. Cuando la inmunogenicidad de un antígeno es baja, este se puede unir a una macromolécula que tenga inmunogenicidad, tal como la albúmina, y luego utilizarse para la inmunización. Adicionalmente, mediante la unión de antígenos con otras moléculas según sea necesario, estos se pueden convertir en antígenos solubles. Cuando se utilizan como antígenos moléculas transmembrana, tales como receptores, pueden usarse como fragmento porciones de las regiones extracelulares de los receptores, o pueden usarse como inmunógenos las células que expresan moléculas transmembrana en su superficie celular.

Las células productoras de anticuerpos pueden obtenerse inmunizando animales, usando los antígenos

sensibilizantes adecuados descritos anteriormente. Como alternativa, las células productoras de anticuerpos pueden prepararse por inmunización *in vitro* de linfocitos que pueden producir anticuerpos. Como animales para la inmunización pueden usarse diversos mamíferos, y se usan generalmente roedores, lagomorfos y primates. Para los roedores, los ejemplos específicos de tales animales incluyen ratones, ratas y hámsteres, conejos para los lagomorfos y monos, incluyendo el mono cinomolgo, el macaco de la India, *Papio hamadryas* y chimpancés para los primates.

Los animales transgénicos que portan repertorios de genes de anticuerpos humanos también son conocidos, y los anticuerpos humanos pueden obtenerse utilizando estos animales (véase el documento WO96/34096; Mendez *et al.*, Nat. Genet. 1997, 15: 146-56). En lugar de usar tales animales transgénicos, los anticuerpos humanos deseados que tienen actividad de unión frente a antígenos pueden obtenerse, por ejemplo, mediante sensibilización *in vitro* de linfocitos humanos con los antígenos deseados o las células que expresan los antígenos deseados, y luego fusionando los linfocitos sensibilizados con células de mieloma humano, tales como U266 (véase la publicación de la solicitud de patente Japonesa Kokoku N.º (JP-B) H1-59878 (solicitud de patente japonesa examinada, aprobada, publicada por oposición). Adicionalmente, los anticuerpos humanos deseados pueden obtenerse inmunizando animales transgénicos que portan un repertorio completo de genes de anticuerpos humanos con los antígenos deseados (véanse los documentos WO93/12227, WO92/03918, WO94/02602, WO96/34096 y WO96/33735).

La inmunización de los animales se lleva a cabo diluyendo y suspendiendo adecuadamente un antígeno sensibilizante en solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica o similar, formando una emulsión, mezclando un adyuvante si es necesario, e inyectando esto en animales por vía intraperitoneal o subcutánea. Después de eso, el antígeno sensibilizante mezclado con el adyuvante incompleto de Freund se administra preferentemente varias veces cada cuatro a 21 días. La producción de anticuerpos se puede confirmar midiendo el título de los anticuerpos que se tienen como objetivo en los sueros de los animales, usando métodos convencionales.

Las células productoras de anticuerpos obtenidas a partir de linfocitos o de animales inmunizados con un antígeno deseado, se pueden fusionar con células de mieloma para generar hibridomas, utilizando agentes de fusión convencionales (por ejemplo, polietilenglicol) (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986, 59-103). Después, según sea necesario, se pueden cultivar y crecer las células de hibridoma, y la especificidad de unión, la afinidad o la actividad del anticuerpo producido a partir de estos hibridomas puede medirse utilizando métodos de análisis conocidos, tales como la inmunoprecipitación, el radioinmunoensayo (RIA) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Posteriormente, los hibridomas que producen los anticuerpos de interés, cuya especificidad de unión, afinidad o actividad se ha determinado, pueden subclonarse por métodos tales como la dilución limitante.

A continuación, los genes que codifican los anticuerpos de interés pueden clonarse a partir de los hibridomas o las células productoras de anticuerpos (linfocitos sensibilizados y similares.) utilizando sondas que pueden unirse específicamente a los anticuerpos (por ejemplo, oligonucleótidos complementarios a las secuencias que codifican las regiones constantes del anticuerpo). Además, es posible la clonación a partir de los ARNm utilizando RT-PCR. Las inmunoglobulinas se clasifican en cinco clases distintas, IgA, IgD, IgE, IgG y IgM. Estas clases se dividen además en varias subclases (isotipos) (por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG-4; IgA-1 e IgA-2; y demás). Las cadenas H y las cadenas L utilizadas en la presente invención para producir anticuerpos no están particularmente limitadas y pueden obtenerse de anticuerpos que pertenecen a cualquiera de estas clases o subclases; sin embargo, la IgG es particularmente preferente.

En el presente documento, es posible modificar los genes que codifican la cadena H y los genes que codifican la cadena L utilizando técnicas de ingeniería genética. Los anticuerpos genéticamente modificados, tales como los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos humanizados, que se han modificado artificialmente con el fin de disminuir la antigenicidad heteróloga y demás, contra los seres humanos, puede producirse adecuadamente para anticuerpos tales como anticuerpos de ratón, anticuerpos de rata, anticuerpos de conejo, anticuerpos del hámster, anticuerpos de oveja y anticuerpos de camello.

Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos compuestos de regiones variables de la cadena H y de la cadena L de anticuerpos de mamíferos no humanos, tales como las de un anticuerpo de ratón, y las regiones constantes de la cadena H y de la cadena L de un anticuerpo humano. Se pueden obtener ligando el ADN que codifica una región variable de un anticuerpo de ratón al ADN que codifica una región constante de un anticuerpo humano, incorporándolos en un vector de expresión e introduciendo el vector en un hospedador para la producción del anticuerpo. Un anticuerpo humanizado también se denomina anticuerpo humano remodelado. Este anticuerpo humanizado se puede sintetizar por PCR a partir de varios oligonucleótidos producidos de modo que tengan porciones solapantes en los extremos de las secuencias de ADN, diseñados para unir las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo de un mamífero no humano (como un ratón). El ADN obtenido puede ligarse a un ADN que codifica una región constante de un anticuerpo humano. El ADN ligado se puede incorporar en un vector de expresión, y el vector se puede introducir en un hospedador para producir el anticuerpo (véanse los documentos EP239400 y WO96/02576). Las FR de anticuerpos humanos que se ligan a través de las CDR se seleccionan cuando las CDR forman un sitio de unión a antígeno favorable. Si es necesario, los aminoácidos en la

región marco conservada de una región variable de anticuerpo pueden sustituirse de modo que las CDR del anticuerpo humano remodelado forman un sitio de unión a antígeno adecuado (K. Sato *et al.*, Cancer Res. 1993, 53: 851-856).

5 Además de las técnicas de humanización descritas anteriormente, los anticuerpos pueden modificarse para mejorar sus propiedades biológicas, por ejemplo, la afinidad antigénica. Dichas modificaciones se pueden llevar a cabo utilizando métodos tales como mutagénesis dirigida (véase, por ejemplo, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488), mutagénesis por PCR y mutagénesis de casete. En general, los anticuerpos mutantes cuyas propiedades biológicas se han mejorado muestran una homología de secuencia de aminoácidos y/o una similitud del 70 % o mayor, más preferentemente del 80 % o mayor, e incluso más preferentemente del 90 % o mayor (por ejemplo, del 95 % o mayor), 97 %, 98 %, 99 %, etc.), cuando se compara con la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo original. En el presente documento, una homología de secuencia y/o similitud se define como la proporción de restos de aminoácidos que son homólogos (el mismo resto) o similares (restos de aminoácidos clasificados en el mismo grupo basándose en las propiedades generales de las cadenas laterales de aminoácidos) a los restos del anticuerpo original, después de que el valor de homología de secuencia se haya maximizado mediante alineamiento de secuencias y la introducción de huecos, según sea necesario. En general, los restos de aminoácidos de origen natural se clasifican en grupos basándose en las características de sus cadenas laterales:

- (1) hidrófobos: alanina, isoleucina, norleucina, valina, metionina y leucina;
- (2) hidrófilos neutros: asparagina, glutamina, cisteína, treonina y serina;
- (3) ácidos: ácido aspártico y ácido glutámico;
- (4) básicos: arginina, histidina y lisina;
- (5) restos que afectan a la orientación de la cadena: glicina y prolina; y
- (6) aromáticos: tirosina, triptófano y fenilalanina.

25 Normalmente, un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo se forma por las interacciones de un total de seis regiones determinantes de complementariedad (porciones hipervariables; CDR) presentes en las regiones variables de la cadena H y la cadena L. Se sabe que incluso una de estas regiones variables tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque la afinidad será menor que la de las regiones variables que contienen todos los sitios de unión. Por lo tanto, con respecto a los genes de anticuerpos de la presente invención que codifican las cadenas H y las cadenas L, los polipéptidos codificados por estos genes solo se precisan para mantener la capacidad de unión a un antígeno deseado y para codificar una porción de fragmento que contiene los respectivos sitios de unión a antígeno de la cadena H y la cadena L.

35 A continuación se proporciona una explicación más detallada sobre el caso de un anticuerpo biespecífico de tipo IgG que tiene dos tipos de regiones constantes de la cadena pesada CH1 (CH1-A y CH1-B) y dos tipos de regiones constantes de la cadena ligera (CL-A y CL-B); sin embargo, la presente invención también se puede aplicar de forma similar a otros anticuerpos.

40 Cuando se desea obtener un anticuerpo biespecífico que reconozca un epítipo mediante la primera CH1-A y la primera CL-A, y otro epítipo mediante la segunda CH1-B y la segunda CL-B, teóricamente, cuando se expresa cada uno de los cuatro tipos de cadenas para producir ese anticuerpo existe la posibilidad de que se puedan producir 10 tipos de moléculas de anticuerpo.

45 En este caso, las moléculas de anticuerpo deseadas pueden adquirirse de forma preferente si, por ejemplo, se regula la asociación de modo que se inhiba la asociación de CH1-A y CL-B y/o entre CH1-B y CL-A.

50 Un ejemplo es la modificación de restos de aminoácidos que forman una interfaz entre CH1-A y CL-B para dar lugar a restos de aminoácidos cargados positivamente y la modificación de restos de aminoácidos que forman una interfaz entre CH1-B y CL-A para dar lugar a restos de aminoácidos cargados negativamente. Como resultado de estas modificaciones, se inhibe la asociación no prevista entre CH1-A y CL-B, dado que los restos de aminoácidos que forman la interfaz están ambos cargados positivamente, y la asociación entre CH1-B y CL-A también se inhibe dado que los restos de aminoácidos que forman la interfaz están ambos cargados negativamente. Por lo tanto, la asociación no prevista entre CH1-A y CL-B y la asociación entre CH1-B y CL-A se inhiben porque los restos de aminoácidos que forman las interfaces tienen la misma carga de forma recíproca. Como resultado, se pueden adquirir de forma eficaz los anticuerpos que tienen la asociación prevista entre CH1-A y CL-A, y la asociación prevista entre CH1-B y CL-B. Además, la asociación prevista entre CH1-A y CL-A se facilita dado que los restos de aminoácidos que forman la interfaz tienen distintos tipos de cargas entre sí; y la asociación prevista entre CH1-B y CL-B se también se facilita dado que los restos de aminoácidos que forman la interfaz tienen distintos tipos de cargas entre sí. Como consecuencia, pueden obtenerse de forma eficaz los anticuerpos con la asociación prevista.

65 Otro ejemplo es la modificación de los restos de aminoácidos que forman la interfaz entre CH1-A y CL-B para dar lugar a restos de aminoácidos cargados positivamente, cuando los restos de aminoácidos que forman la interfaz entre CL-A y CH1-B son, de forma recíproca, aminoácidos no cargados o no polares. Como resultado de esta modificación, la asociación no prevista entre CH1-A y CL-B se inhibe porque los restos de aminoácidos que forman la interfaz están cargados ambos positivamente. Por otro lado, dado que los restos de aminoácidos que forman las

interfases son aminoácidos que no se repelen eléctricamente entre sí, la asociación prevista entre CH1-A y CL-A, y la asociación prevista entre CH1-B y CL-B se producirá más fácilmente que en el caso en que los aminoácidos se repelen eléctricamente. Como consecuencia, se pueden obtener de forma eficaz los anticuerpos que tienen la asociación prevista entre CH1-A y CL-A, y la asociación prevista entre CH1-B y CL-B. Al mismo tiempo, en este ejemplo, en el caso en que los restos de aminoácidos que forman la interfaz entre CL-A y CH1-B son, de forma recíproca, aminoácidos no cargados o no polares, pueden modificarse para convertirse en aminoácidos no polares o no cargados de forma recíproca.

En otro ejemplo, cuando los restos de aminoácidos que forman la interfaz entre CL-B y CH1-B son, de forma recíproca, aminoácidos no cargados o no polares, uno de los restos de aminoácidos que forman la interfaz entre CH1-A y CL-A se modifica para dar lugar a un resto de aminoácido cargado positivamente, y el otro se modifica para dar lugar a un resto de aminoácido cargado negativamente. Como resultado de esta modificación, aunque la asociación prevista entre CH1-A y CL-A se facilita porque los restos de aminoácidos que forman la interfaz son una combinación de carga positiva y de carga negativa, la asociación prevista entre CH1-B y CL-B no se inhibe porque los restos de aminoácidos que forman la interfaz son aminoácidos que no se repelen eléctricamente de forma recíproca. Como resultado, se puede obtener de forma eficaz un anticuerpo que tenga una asociación prevista entre CH1-A y CL-A, y una asociación prevista entre CH1-B y CL-B. Mientras tanto, en este ejemplo, cuando los restos de aminoácidos que forman la interfaz entre CL-B y CH1-B no son aminoácidos no cargados o no polares de forma recíproca, pueden modificarse para convertirse en aminoácidos no polares o no cargados de forma recíproca.

Además, en otro ejemplo, cuando los restos de aminoácidos que forman la interfaz entre CL-B y CH1-B son aminoácidos no cargados o no polares en CH1-B, uno de los restos de aminoácidos que forman la interfaz entre CH1-A y CL-A se modifica para dar lugar a un resto de aminoácido cargado positivamente mientras que el otro se modifica para dar lugar a un resto de aminoácido cargado negativamente; y los restos de aminoácidos en CL-B que forman la interfaz entre CL-B y CH1-B, se modifican para que tengan la misma carga que la modificación hecha en CH1-A. Como resultado de esta modificación, aunque la asociación prevista entre CH1-A y CL-A se facilita porque los restos de aminoácidos que forman la interfaz son una combinación de carga positiva y de carga negativa, la asociación prevista entre CH1-B y CL-B no se inhibe porque los restos de aminoácidos que forman la interfaz son aminoácidos que no se repelen eléctricamente de forma recíproca. Como resultado, se puede obtener de forma eficaz un anticuerpo que tenga una asociación prevista entre CH1-A y CL-A, y una asociación prevista entre CH1-B y CL-B. Mientras tanto, en este ejemplo, cuando los restos de aminoácidos que forman la interfaz entre CL-B y CH1-B no son aminoácidos no cargados o no polares en CH1-B, pueden modificarse para convertirse en aminoácidos no polares o no cargados.

Además, el uso de la regulación de la asociación en el contexto de la presente invención hace posible suprimir la asociación entre los CHI (CH1-A y CH1-B), o la asociación entre los CL (CL-A y CL-B).

Los expertos en la materia podrían determinar de forma adecuada los tipos de restos de aminoácidos que se acercan durante la asociación en la interfaz de CH1 y CL, en un polipéptido deseado, para el que se desea la regulación de la asociación mediante la presente invención.

Adicionalmente, los expertos en la materia también pueden adquirir de forma adecuada las secuencias que pueden usarse como CH1 o CL de un anticuerpo en un organismo tal como un ser humano, mono, ratón, conejo y similares, mediante el uso de una base de datos pública y demás. De manera más específica, la información de las secuencias de aminoácidos de CH1 o CL se puede adquirir por los medios descritos en los Ejemplos que se describen a continuación.

Por ejemplo, con respecto a los anticuerpos biespecíficos descritos en los Ejemplos a continuación, los ejemplos específicos de restos de aminoácidos que se acercan (que se enfrentan o están en contacto) en la asociación, en la interfaz de CH1 y CL, incluyen las combinaciones que se muestran a continuación:

- lisina (K) en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU en CH1 (por ejemplo, la posición 147 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1) y la treonina (T) enfrentada (en contacto) en la posición 180 como se indica mediante la numeración de EU en CL;
- lisina (K) en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU en CH1 y la serina (S) enfrentada (en contacto) en la posición 131 como se indica mediante la numeración de EU en CL;
- glutamina (Q) en la posición 175 como se indica mediante la numeración de EU en CH1 y la glutamina (Q) enfrentada (en contacto) en la posición 160 como se indica mediante la numeración de EU en CL; y,
- lisina (K) en la posición 213 como se indica mediante la numeración de EU en CH1 y el ácido glutámico (E) enfrentado (en contacto) en la posición 123 como se indica mediante la numeración de EU en CL.

Los números descritos en la numeración de EU en la presente invención se indican en conformidad con la numeración de EU (Sequences of proteins of immunological interest, publicación NIH N.º 91-3242). Las frases "un resto de aminoácido en la posición X como se indica mediante la numeración de EU" y "un aminoácido en la posición X como se indica mediante la numeración de EU" (donde X es un número arbitrario) también se pueden leer como "un resto de aminoácido que corresponde a la posición X como se indica mediante la numeración de EU" y "un

aminoácido que corresponde a la posición X como se indica mediante la numeración de EU".

Como se indica en los Ejemplos descritos a continuación, los anticuerpos deseados se pueden adquirir preferentemente modificando estos restos de aminoácidos y llevando a cabo los métodos de la presente invención.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo IgG biespecífico, como se define en las reivindicaciones, en el que la asociación de la cadena pesada y de la cadena ligera está regulada, en donde uno o dos o más conjuntos de restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos mostrados en (a) a (c) a continuación en la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo, son restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca:

(a) el resto de aminoácido contenido en la región constante de la cadena pesada (CHI) en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en la región constante de la cadena ligera (CL) en la posición 180 como se indica mediante la numeración de EU;

(b) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 131 como se indica mediante la numeración de EU; y

(c) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 175 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 160 como se indica mediante la numeración de EU.

Como otra realización, la presente invención proporciona adicionalmente dicho anticuerpo, en que los restos de aminoácidos en el conjunto de restos de aminoácidos de (d) a continuación son restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca:

(d) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 213 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 123 como se indica mediante la numeración de EU.

En el anticuerpo mencionado anteriormente, los "restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca" o "restos de aminoácidos que tienen la misma carga" se seleccionan de los restos de aminoácidos contenidos en, por ejemplo, cualquier conjunto (X) o (Y) a continuación:

(X) ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D); o

(Y) lisina (K), arginina (R) o histidina (H).

En el anticuerpo mencionado anteriormente, los ejemplos específicos de restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca incluyen los siguientes restos de aminoácidos:

- el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 175 como se indica mediante la numeración de EU es lisina (K), y los restos de aminoácidos contenidos en CL en la posición 180, posición 131 y posición 160, como se indica mediante la numeración de EU son todos ácido glutámico (E); y,

- los restos de aminoácidos contenidos en CH1 en la posición 147 y en la posición 175 como se indica mediante la numeración de EU son ácido glutámico (E), y los restos de aminoácidos contenidos en CL en la posición 180, posición 131 y posición 160, como se indica mediante la numeración de EU son todos lisina (K).

En el anticuerpo mencionado anteriormente, los ejemplos de restos de aminoácidos que no se repelen eléctricamente incluyen adicionalmente uno en el que el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 213 como se indica mediante la numeración de EU es ácido glutámico (E), y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 123 como se indica mediante la numeración de EU es lisina (K).

Además, los métodos para producir un anticuerpo mencionado anteriormente y los métodos de la presente invención para regular la asociación a través de la modificación de los restos de aminoácidos en los conjuntos de restos de aminoácidos de (a) a (d) mencionados anteriormente para dar lugar a restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca, son también realizaciones preferentes de la presente invención.

Adicionalmente, se proporciona un anticuerpo en el que la asociación de la cadena pesada y la cadena ligera está regulada, en donde uno o dos o más conjuntos de restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos mostrados en (a) a (c) a continuación en la asociación de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo, son restos de aminoácidos que no se repelen eléctricamente de forma recíproca:

(a) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 180 como se indica mediante la numeración de EU;

(b) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 131 como se indica mediante la numeración de EU; y

(c) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 175 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 160 como se indica mediante la numeración de EU.

Se proporciona adicionalmente dicho anticuerpo en que restos de aminoácidos en el conjunto de restos de aminoácidos mostrados en (d) a continuación son restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma

recíproca: (d) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 213 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 123 como se indica mediante la numeración de EU.

Como se indica en los Ejemplos descritos a continuación y en la Fig. 1, cada uno de los restos de aminoácidos de las combinaciones mencionadas anteriormente se aproximan de forma recíproca en la asociación. Los expertos en la materia serán capaces de encontrar los sitios correspondientes a los restos de aminoácidos descritos en (a) a (d) mencionados anteriormente para el CH1 o CL deseado mediante modelado de homología y demás, utilizando un programa informático disponible en el mercado, y de modificar adecuadamente los restos de aminoácidos en esos sitios.

En el anticuerpo mencionado anteriormente, los "restos de aminoácidos que no se repelen eléctricamente de forma recíproca" se seleccionan preferentemente de, por ejemplo, cada uno de los dos conjuntos seleccionados del grupo que consiste en (X) a (Z) mostrados a continuación, y donde los dos conjuntos se seleccionan de entre las combinaciones de (X) e (Y), (X) y (Z), (Y) y (Z), y (Z) y (Z):

- (X) ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D);
- (Y) lisina (K), arginina (R) o histidina (H);
- (Z) alanina (A), asparagina (N), cisteína (C), glutamina (Q), glicina (G), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), fenilalanina (F), prolina (P), serina (S), treonina (T), triptófano (W), tirosina (Y) o valina (V).

Un ejemplo implica seleccionar (X) e (Y) del grupo que consiste en (X) a (Z), seleccionar ácido glutámico de (X) y seleccionar lisina (K) de (Y); y modificar el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU a ácido glutámico (E), y modificar el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 180 como se indica mediante la numeración de EU a lisina (K). En este caso, no hay necesidad de modificar el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU si el resto de aminoácido es ácido glutámico (E) desde antes de la modificación.

En el anticuerpo mencionado anteriormente, los ejemplos específicos de restos de aminoácidos que no se repelen eléctricamente de forma recíproca incluyen los restos de aminoácidos mostrados a continuación:

- el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 175 como se indica mediante la numeración de EU es lisina (K), y los restos de aminoácidos contenidos en CL en la posición 180, posición 131 y posición 160, como se indica mediante la numeración de EU son todos ácido glutámico (E); y
- los restos de aminoácidos contenidos en CH1 en la posición 147 y en la posición 175 como se indica mediante la numeración de EU son ácido glutámico (E), y los restos de aminoácidos contenidos en CL en la posición 180, posición 131 y posición 160, como se indica mediante la numeración de EU son todos lisina (K).

En el anticuerpo mencionado anteriormente, los ejemplos de restos de aminoácidos que no se repelen eléctricamente incluyen adicionalmente uno en el que el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 213 como se indica mediante la numeración de EU es ácido glutámico (E), y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 123 como se indica mediante la numeración de EU es lisina (K).

Además, también se proporcionan métodos para producir un anticuerpo mencionado anteriormente y métodos para regular la asociación a través de la modificación de los restos de aminoácidos en los conjuntos de restos de aminoácidos en (a) a (d) mencionados anteriormente, para dar lugar a restos de aminoácidos que no se repelen eléctricamente de forma recíproca.

Pueden aplicarse adicionalmente al anticuerpo de la presente invención (véase el documento WO 2006/106905) una técnica para introducir la repulsión eléctrica en la interfaz de la segunda región constante de la cadena pesada (CH2) o la tercera región constante de la cadena pesada (CH3) para suprimir la asociación no deseada entre cadenas pesadas, una técnica para introducir la repulsión eléctrica en la interfaz de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera para suprimir la asociación no prevista entre la cadena pesada y la cadena ligera, o una técnica para modificar los restos de aminoácidos que forman un núcleo hidrófobo presente en la interfaz de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera para dar lugar a aminoácidos polares que tienen una carga eléctrica para suprimir la asociación no prevista entre la cadena pesada y la cadena ligera.

En la técnica que suprime la asociación no prevista entre cadenas pesadas mediante la introducción de la repulsión eléctrica en la interfaz de CH2 o CH3, los ejemplos de restos de aminoácidos que están en contacto en la interfaz de otras regiones constantes de la cadena pesada incluyen a las regiones correspondientes a la posición 377 (posición 356) y la posición 470 (posición 439), posición 378 (posición 357) y posición 393 (posición 370), y posición 427 (posición 399) y posición 440 (posición 409) en la región CH3. Para la numeración de las regiones constantes de anticuerpos, se puede hacer referencia a la publicación de Kabat *et al.* (Kabat, E.A., *et al.*, 1991, Secuencias de proteínas de interés inmunológico, NIH); y para la numeración de las regiones constantes de la cadena pesada de anticuerpos, la numeración de EU se muestra dentro de los paréntesis.

La técnica para modificar el resto de aminoácido en la posición 435 como se indica mediante la numeración de EU, que es un sitio relacionado con la unión entre IgG y la Proteína A, a un aminoácido que tenga una fuerza de unión distinta hacia la Proteína A, tal como Arg, también se puede usar en el anticuerpo de la presente invención en combinación con las técnicas mencionadas anteriormente. Al utilizar esta técnica, la interacción entre la cadena H y la Proteína A se puede cambiar, y utilizando una columna de Proteína A solo se pueden purificar de forma eficaz anticuerpos heterodiméricos. Esta técnica también se puede utilizar de forma independiente, sin combinar con las técnicas mencionadas anteriormente.

De manera más específica, por ejemplo, en un anticuerpo que contiene dos tipos de regiones CH3 de cadena pesada, se puede hacer que se repelan eléctricamente de forma recíproca uno a tres conjuntos de restos de aminoácidos en la región CH3 de la primera cadena pesada, que se seleccionan de los conjuntos de restos de aminoácidos de (1) a (3) a continuación:

- (1) los restos de aminoácidos contenidos en la región CH3 de la cadena pesada, en la posición 356 y en la posición 439 como se indica mediante la numeración de EU;
- (2) los restos de aminoácidos contenidos en la región CH3 de la cadena pesada, en la posición 357 y en la posición 370 como se indica mediante la numeración de EU; y
- (3) los restos de aminoácidos contenidos en la región CH3 de la cadena pesada, en la posición 399 y en la posición 409 como se indica mediante la numeración de EU.

Además, el anticuerpo puede ser un anticuerpo que tiene un conjunto de restos de aminoácidos en la región CH3 de la segunda cadena pesada distinto de la región CH3 de la primera cadena pesada mencionada anteriormente, en donde el conjunto de restos de aminoácidos se selecciona de los conjuntos de restos de aminoácidos que se muestran anteriormente en (1) a (3), y en donde los uno a tres conjuntos de restos de aminoácidos que corresponden a los conjuntos de restos de aminoácidos que se muestran anteriormente en (1) a (3), que se repelen eléctricamente de forma recíproca en la región CH3 de la primera cadena pesada, no se repelen eléctricamente de los restos de aminoácidos correspondientes en la región CH3 de la primera cadena pesada.

Los restos de aminoácidos descritos anteriormente en (1) a (3) se aproximan entre sí en la asociación. Los expertos en la materia serán capaces de encontrar los sitios correspondientes a los restos de aminoácidos descritos en (1) a (3) mencionados anteriormente para una región CH3 de la cadena pesada o una región constante de la cadena pesada deseada mediante modelado de homología y demás, utilizando un programa informático disponible en el mercado, y de modificar adecuadamente los restos de aminoácidos en esos sitios.

En el anticuerpo mencionado anteriormente, "que se repelen eléctricamente" o "que tiene una misma carga" significa que, por ejemplo, dos o más restos de aminoácidos cualesquiera tienen restos de aminoácidos que están contenidos en uno de los grupos de (X) e (Y) mencionados anteriormente. Por otro lado, "que no se repelen eléctricamente" significa que, por ejemplo, el anticuerpo tiene restos de aminoácidos que se seleccionan de cada uno de los dos conjuntos seleccionados del grupo que consiste en (X) e (Y) mencionados anteriormente y (Z) a continuación, y donde los dos conjuntos se seleccionan entre las combinaciones de (X) e (Y), (X) y (Z), (Y) y (Z), y (Z) y (Z): (Z) alanina (A), asparagina (N), cisteína (C), glutamina (Q), glicina (G), isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), fenilalanina (F), prolina (P), serina (S), treonina (T), triptófano (W), tirosina (Y) o valina (V).

En una realización preferente del anticuerpo mencionado anteriormente, la región CH3 de la primera cadena pesada y la región CH3 de la segunda cadena pesada pueden estar entrecruzadas por enlaces disulfuro.

En la presente invención, un resto de aminoácido sometido a "modificación" no se limita a un resto de aminoácido de la región variable del anticuerpo o la región constante del anticuerpo mencionadas anteriormente. Los expertos en la materia podrían encontrar restos de aminoácidos que forman una interfaz en una variante polipeptídica o multímero heteromérico mediante modelado de homología y similares, utilizando un programa informático disponible en el mercado, y modificar los restos de aminoácidos en esos sitios para regular la asociación. El modelado de homología es una técnica para predecir la estructura tridimensional de una proteína utilizando un programa informático disponible en el mercado. Al construir la estructura de una proteína con estructura tridimensional desconocida, primero se busca una proteína que se ha determinado que tiene una estructura tridimensional altamente homóloga con la proteína. A continuación, utilizando esta estructura tridimensional como molde, se construye la estructura de la proteína con estructura desconocida, y la estructura se optimiza adicionalmente mediante métodos de dinámica molecular y similares, para predecir la estructura tridimensional de la proteína desconocida.

En la técnica para introducir la repulsión eléctrica en la interfaz de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera para suprimir la asociación no deseada de la cadena pesada y la cadena ligera, los ejemplos de restos de aminoácidos que están en contacto en la interfaz de la región variable de la cadena pesada (VH) y la región variable de la cadena ligera (VL) incluyen glutamina (Q) en la posición 39 como se indica mediante la numeración de Kabat en la región variable de la cadena pesada (región FR2) y la glutamina (Q) enfrentada (en contacto) en la posición 38 como se indica mediante la numeración de Kabat en la región variable de la cadena ligera (FR2). Además, un ejemplo preferente es leucina (L) en la posición 45 de acuerdo con la numeración de Kabat en la región variable de la cadena pesada (FR2) y la prolina (P) enfrentada en la posición 44 de acuerdo con la

numeración de Kabat en la región variable de la cadena ligera (FR2). Para la numeración de estos sitios se hizo referencia a la publicación de Kabat *et al.* (Kabat, E.A., *et al.*, 1991, Sequence of Proteins of Immunological Interest, NIH).

5 Dado que se sabe que estos restos de aminoácidos están altamente conservados en humanos y ratones (J. Mol. Recognit. 2003; 16: 113-120), la asociación de las regiones variables de anticuerpos se puede regular para la asociación VH-VL de anticuerpos distintos de los indicados en los Ejemplos, modificando los restos de aminoácidos correspondientes a los restos de aminoácidos mencionados anteriormente.

10 Un ejemplo específico es un anticuerpo en el que dos o más restos de aminoácidos que forman la interfaz de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera son restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca.

15 De manera más específica, los ejemplos incluyen un anticuerpo con un conjunto o dos conjuntos de restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos mostrados en (a) o (b) a continuación:

(b) el resto de aminoácido contenido en la región variable de la cadena pesada (1) en la posición 39 como se indica mediante la numeración de Kabat, y el resto de aminoácido contenido en la cadena ligera (2) en la posición 38 como se indica mediante la numeración de Kabat; o

(b) el resto de aminoácido contenido en la región variable de la cadena pesada (3) en la posición 45 como se indica mediante la numeración de Kabat, y el resto de aminoácido contenido en la región variable de la cadena ligera (4) en la posición 44 como se indica mediante la numeración de Kabat.

25 Cada uno de los restos de aminoácidos descritos en (a) o (b) mencionados anteriormente se aproximan de forma recíproca en la asociación. Los expertos en la materia serán capaces de encontrar los sitios que corresponden a los restos de aminoácidos descritos en (a) o (b) mencionados anteriormente en una región variable de la cadena pesada o una región variable de la cadena ligera deseada mediante modelado de homología y similares, utilizando un programa informático disponible en el mercado, y de modificar adecuadamente los restos de aminoácidos en esos sitios.

30 En el anticuerpo mencionado anteriormente, los "restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca" se seleccionan preferentemente de los restos de aminoácidos contenidos en, por ejemplo, cualquiera de los conjuntos (X) e (Y) a continuación:

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

40 Además, otra realización del anticuerpo de la presente invención es, por ejemplo, un anticuerpo en el que dos o más restos de aminoácidos que forman la interfaz de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera son restos de aminoácidos que no se repelen eléctricamente entre sí. Específicamente, un ejemplo de tal anticuerpo es uno que tiene un conjunto o dos conjuntos de restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos mostrados en (a) y (b) anteriormente mencionados.

45 Los restos de aminoácidos respectivos descritos en (a) o (b) mencionados anteriormente están cercanos entre sí en la asociación. Los expertos en la materia serán capaces de encontrar los sitios que corresponden a los restos de aminoácidos descritos en (a) o (b) mencionados anteriormente para una región variable de la cadena pesada o una región variable de la cadena ligera deseada mediante modelado de homología y similares, utilizando un programa informático disponible en el mercado, y de someter a modificación de forma adecuada los restos de aminoácidos en esos sitios.

50 En el anticuerpo mencionado anteriormente, "restos de aminoácidos que no se repelen eléctricamente de forma recíproca" se refiere a, por ejemplo, restos de aminoácidos seleccionados de cada uno de los dos conjuntos seleccionados del grupo que consiste en (X) a (Z) mencionados anteriormente, y donde los dos conjuntos se seleccionan de entre las combinaciones de (X) e (Y), (X) y (Z), (Y) y (Z), y (Z) y (Z).

55 En general, los restos de aminoácidos descritos en (a) o (b) mencionados anteriormente, en seres humanos y ratones son:

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

65 Por lo tanto, en una realización preferente de la presente invención, estos restos de aminoácidos se someten a modificación (tal como la sustitución por aminoácidos que tienen una carga eléctrica). Adicionalmente, los tipos de

restos de aminoácidos de los (a) o (b) anteriormente mencionados no se limitan necesariamente a los restos de aminoácidos mencionados anteriormente, sino que también pueden ser otros aminoácidos equivalentes a estos aminoácidos. Por ejemplo, el aminoácido en la posición 38 como se indica mediante la numeración de Kabat, en la región variable de la cadena ligera, puede ser, por ejemplo, histidina (H) en el caso de los seres humanos.

En la técnica para modificar restos de aminoácidos que forman un núcleo hidrófobo presente en la interfaz de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera para dar lugar a aminoácidos polares que tienen una carga eléctrica, para suprimir la asociación no prevista entre la cadena pesada y la cadena ligera, os ejemplos preferentes de restos de aminoácidos que pueden formar un núcleo hidrófobo en la interfaz de la región variable de la cadena pesada (VH) y la región variable de la cadena ligera (VL) incluyen leucina (L) en la posición 45, como se indica mediante la numeración de Kabat en la región variable de la cadena pesada (FR2) y la prolina (P) enfrentada en la posición 44 como se indica mediante la numeración de Kabat en la región variable de la cadena ligera (FR2). Para la numeración de estos sitios, se usó como referencia Kabat *et al.* (Kabat, E.A., *et al.*, 1991, Sequence of Proteins of Immunological Interest, NIH).

En general, la expresión "núcleo hidrófobo" se refiere a una parte que está formada por un ensamblaje de cadenas laterales de aminoácidos hidrófobos en el interior de los polipéptidos asociados. Los ejemplos de aminoácidos hidrófobos incluyen alanina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano y valina. Adicionalmente, pueden estar implicados en la formación de un núcleo hidrófobo restos de aminoácidos que no sean de aminoácidos hidrófobos (por ejemplo, tirosina). Este núcleo hidrófobo, junto con una superficie hidrófila, en la que las cadenas laterales de aminoácidos hidrófilos están expuestas al exterior, se convierte en una fuerza impulsora para propiciar la asociación de polipéptidos solubles en agua. Cuando los aminoácidos hidrófobos de dos dominios distintos están presentes en una superficie molecular y se exponen a moléculas de agua, la entropía aumenta y la energía libre aumenta. Por consiguiente, los dos dominios se asociarán entre sí para disminuir la energía libre y volverse estables, y los aminoácidos hidrófobos en la interfaz se ocultarán en el interior de la molécula para formar un núcleo hidrófobo.

Se piensa que cuando se produce la asociación de polipéptidos, la formación de un núcleo hidrófobo se inhibe al modificar los aminoácidos hidrófobos que forman el núcleo hidrófobo a aminoácidos polares que tienen una carga eléctrica; y por consiguiente, se cree que la asociación de polipéptidos está inhibida.

Los expertos en la materia podrían reconocer la presencia o ausencia de un núcleo hidrófobo, el sitio de formación (región) y similares mediante el análisis de las secuencias de aminoácidos para un polipéptido deseado. En concreto, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo caracterizado porque los restos de aminoácidos capaces de formar un núcleo hidrófobo en una interfaz se modifican a restos de aminoácidos que tienen una carga eléctrica. De manera más específica, los ejemplos incluyen un anticuerpo en el que los restos de aminoácidos mostrados en (1) o (2) a continuación son restos de aminoácidos que tienen una carga eléctrica. Las cadenas laterales de los restos de aminoácidos mostrados en (1) y (2) a continuación son adyacentes entre sí, y pueden formar un núcleo hidrófobo:

- (1) el resto de aminoácido contenido en la región variable de la cadena pesada, en la posición 45 como se indica mediante la numeración de Kabat; y
- (2) el resto de aminoácido contenido en la región variable de la cadena ligera, en la posición 44 como se indica mediante la numeración de Kabat.

Los ejemplos preferentes de restos de aminoácidos que tienen una carga eléctrica en el anticuerpo mencionado anteriormente incluyen ácido glutámico (E), ácido aspártico (D), lisina (K), arginina (R) e histidina (H). Los ejemplos más preferentes incluyen ácido glutámico (E) y lisina (K).

En general, los restos de aminoácidos descritos en (1) y (2) mencionados anteriormente, en seres humanos y ratones son, respectivamente:

- (1) leucina (L) y
- (2) prolina (P).

Por lo tanto, en una realización preferente de la presente invención, estos restos de aminoácidos se someten a modificación (tal como la sustitución por aminoácidos que tienen una carga eléctrica). Adicionalmente, los tipos de restos de aminoácidos de (1) y (2) anteriormente mencionados no se limitan necesariamente a los restos de aminoácidos mencionados anteriormente, sino que también pueden ser otros aminoácidos equivalentes a estos restos de aminoácidos.

Se pueden aplicar otras técnicas conocidas a los anticuerpos de la presente invención. Por ejemplo, para favorecer la asociación del primer VH (VH1) y el primer VL (VL1) y/o el segundo VH (VH2) y el segundo VL (VL2), una cadena lateral de aminoácido presente en la región variable de una de las cadenas H pueden sustituirse por una cadena lateral más grande (botón), y una cadena lateral de aminoácido presente en la región variable opuesta de la otra cadena H puede sustituirse por una cadena lateral más pequeña (ojal), de modo que el "botón" pueda colocarse en el orificio, y se favorezca la asociación de VH1 y VL1 y/o VH2 y VL2; y por consiguiente, la asociación de VH1 y VL2

y/o VH2 y VL1 se puede suprimir aún más (documento WO 1996/027011; Ridgway, J.B., *et al.*, Protein Engineering (1996) 9, 617-621; Merchant, A.M., *et al.*, Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681).

Por ejemplo, en el caso de la IgG1 humana, para hacer una cadena lateral de aminoácido en la región CH3 de una cadena H una cadena lateral más grande ("botón"), se hacen las modificaciones Y349C y T366W, y para hacer una cadena lateral de aminoácido en la región CH3 de la otra cadena H una cadena lateral más pequeña, las modificaciones D356C, T336S, L368A e Y407V.

Se pueden aplicar aún otras técnicas conocidas a los anticuerpos de la presente invención. Un anticuerpo que se tenga como objetivo puede prepararse de forma eficaz por asociación complementaria de CH3 utilizando el dominio CH3 diseñado técnicamente de intercambio de cadenas, en que una porción de un CH3 de una cadena H de un anticuerpo se cambia a una secuencia procedente de IgA correspondiente a esa porción, y una porción complementaria de CH3 de la otra cadena H se introduce con una secuencia procedente de IgA correspondiente a esa porción (Protein Engineering Design & Selection, 23: 195-202, 2010).

Se pueden aplicar aún otras técnicas conocidas a los anticuerpos de la presente invención. Al producir anticuerpos biespecíficos, un anticuerpo biespecífico que se tiene como objetivo puede prepararse, por ejemplo, impartiendo una diferencia en el punto isoeléctrico realizando distintas modificaciones de aminoácidos en cada una de las regiones variables de los dos tipos de cadenas H, y utilizando esa diferencia en el punto isoeléctrico para la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico (documento WO 2007/114325).

Las modificaciones en contexto con la presente invención se pueden usar en anticuerpos tales como el que se muestra a continuación, por ejemplo, un anticuerpo que tiene una estructura en la cual, para favorecer la asociación de un primer VH (VH1) y un primer VL (VL1) y/o un segundo VH (VH2) y un segundo VL (VL2), VH1 se une a una región Fc a través de un primer CH1 y VL1 se une a un primer CL, y VH2 se une a otra región Fc a través de un segundo CL y VL2 se une a un segundo CH1 (documento WO 09/80254).

Para el anticuerpo de la presente invención se puede usar en combinación una pluralidad, por ejemplo dos o más, de las técnicas conocidas mencionadas anteriormente. Adicionalmente, el anticuerpo de la presente invención puede prepararse basándose en un anticuerpo al que se le han realizado las modificaciones de las técnicas conocidas mencionadas anteriormente.

Los métodos de la presente invención para regular la asociación mencionados a continuación permiten, por ejemplo, la producción eficaz de anticuerpos o polipéptidos que son activos. Los ejemplos de tales actividades incluyen la actividad de unión, la actividad neutralizante, la actividad citotóxica, la actividad agonista, la actividad antagonista y la actividad enzimática, y similares. La actividad agonista es una actividad que induce algún tipo de cambios en la actividad fisiológica a través de la unión de un anticuerpo a un antígeno, tal como un receptor, lo que provoca la transducción de señales, o similar, en las células. Los ejemplos de actividad fisiológica incluyen la actividad de crecimiento, la actividad de supervivencia, la actividad de diferenciación, la actividad transcripcional, la actividad de transporte de membrana, la actividad de unión, la actividad proteolítica, la actividad de fosforilación/desfosforilación, la actividad redox, la actividad de transferencia, la actividad nucleolítica, la actividad de deshidratación, la actividad inductora de muerte celular y la actividad inductora de apoptosis, y demás, pero no se limita a las mismas.

Los anticuerpos o polipéptidos que reconocen los antígenos deseados o se unen a los receptores deseados pueden producirse de manera eficaz mediante los métodos de la presente invención.

Los antígenos en el contexto de la presente invención no están particularmente limitados, y puede usarse cualquier tipo de antígeno. Los ejemplos de antígenos incluyen receptores o sus fragmentos, de antígenos de cáncer, antígenos de MHC y antígenos de diferenciación, y similares, pero no se limitan particularmente a los mismos.

Los ejemplos de los receptores en el contexto de la presente invención incluyen receptores que pertenecen a la familia de receptores del factor hematopoyético, la familia de receptores de citocinas, la familia de receptores de tipo tirosina quinasas, la familia de receptores de tipo serina/treonina quinasas, la familia de receptores de TNF, la familia del receptor acoplado a proteína G, la familia de receptor anclado a GPI, la familia de receptores de tipo tirosina fosfatasa, la familia de factores de adhesión, la familia de receptores de hormonas, y demás. Los informes sobre los receptores que pertenecen a estas familias de receptores y sus características se pueden encontrar en diversas fuentes documentales, por ejemplo, en Cooke BA., King RJB., van der Molen HJ. ed. New Comprehensive Biochemistry Vol. 18B "Hormones and their Actions Part II" pág. 1-46 (1988) Elsevier Science Publishers BV., Nueva York, EE.UU; Patthy L. (1990) Cell, 61: 13-14; Ullrich A., *et al.* (1990) Cell, 61: 203-212; Massagui J. (1992) Cell, 69: 1067-1070; Miyajima A., *et al.* (1992) Annu. Rev. Immunol., 10: 295-331; Taga T. y Kishimoto T. (1992) FASEB J., 7: 3387-3396; Fantl Wl., *et al.* (1993) Annu. Rev. Biochem., 62: 453-481; Smith CA., *et al.* (1994) Cell, 76: 959-962; Flower DR. (1999) Biochim. Biophys. Acta, 1422: 207-234; Miyasaka M. ed. Cell Technology, Serie de manuales "Handbook for adhesion factors" (1994) Shujunsha, Tokio, Japón; y demás. Los ejemplos de receptores específicos que pertenecen a las familias de receptores mencionadas anteriormente incluyen el receptor de eritropoyetina (EPO) humano o de ratón, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humano o de ratón, el receptor de trombopoyetina (TPO) humano o de ratón, el receptor de insulina humano o de ratón, el receptor del ligando Flt-3

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

Los antígenos de cáncer son antígenos que se expresan después de la transformación maligna de una célula y también se denominan antígenos específicos de tumor. Además, las cadenas de azúcar anómalas que aparecen en la superficie celular o en una molécula proteica, cuando la célula se ha vuelto cancerosa, también son antígenos de cáncer, y también se denominan antígenos de cadenas de azúcares de cáncer. Los ejemplos de antígenos de cáncer incluyen EpCAM, que se expresa en múltiples cánceres, incluido el cáncer de pulmón *Natl. Acad. Sci. USA* (1989) 86 (1), 27-31 (la secuencia polinucleotídica de la misma se indica como número de referencia RefSeq NM_002354.2 (SEQ ID NO: 78) y la secuencia polipeptídica de la misma se indica como N.º de referencia RefSeq NP_002345.2 (SEQ ID NO: 79)), CA19-9, CA15-3, sialil SSEA-1 (SLX), etc.

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

Los antígenos de diferenciación incluyen CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15s, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD32, CD33, CD34, CD35, CD38, CD40, CD41a, CD41b, CD42a, CD42b, 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.

El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo biespecífico; y en ese caso, dos antígenos (o epítomos) reconocidos por ese anticuerpo pueden seleccionarse arbitrariamente de los receptores mencionados anteriormente o de fragmentos de los mismos, de antígenos de cáncer, antígenos MHC, antígenos de diferenciación y similares. Por ejemplo, dos antígenos pueden seleccionarse de receptores o fragmentos de los mismos, dos pueden seleccionarse de antígenos de cáncer, dos pueden seleccionarse de antígenos de MHC, o dos pueden seleccionarse de antígenos de diferenciación. Además, cada antígeno puede seleccionarse entre dos antígenos seleccionados arbitrariamente, por ejemplo, de receptores o fragmentos de los mismos, de antígenos de cáncer, antígenos de MHC y antígenos de diferenciación.

Además, la presente invención proporciona un método como se define en las reivindicaciones para producir un anticuerpo en el que la asociación de la cadena pesada y la cadena ligera está regulada.

Una realización preferente del método de producción de la presente invención es un método para producir un anticuerpo en el que la asociación de la cadena pesada y de la cadena ligera está regulada, como se define en las reivindicaciones, que comprende:

(1) la modificación de los ácidos nucleicos que codifican CH1 y CL de modo que un conjunto o dos o más conjuntos de restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos mostrados en (a) a (c) a continuación se vuelvan restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente entre sí:

(a) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 180 como se indica mediante la numeración de EU;

(b) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 131 como se indica mediante la numeración de EU; y

(c) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 175 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 160 como se indica mediante la numeración de EU,

(2) la introducción de los ácidos nucleicos modificados en células hospedadoras y el cultivo de modo que las células hospedadoras expresen los ácidos nucleicos, y

(3) la recogida de un anticuerpo de un cultivo celular de las células hospedadoras.

Otra realización del método de producción de la presente invención incluye un método de producción de un anticuerpo, en donde la etapa (1) del método de producción mencionado anteriormente comprende adicionalmente la modificación de los ácidos nucleicos de modo que los restos de aminoácidos del conjunto de restos de aminoácidos mostrados en (d) a continuación se vuelvan restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente entre sí:

(d) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 213 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 123 como se indica mediante la numeración de EU.

Además, la presente invención se refiere a un método de producción que comprende, en la etapa (1) mencionada anteriormente, la modificación de los ácidos nucleicos de modo que los restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente entre sí se seleccionen entre los restos de aminoácidos contenidos en cualquiera de los grupos de los mencionados anteriormente (X) e (Y).

Además, la presente invención se refiere a un método de producción que comprende en la etapa (1) mencionada anteriormente, la modificación de los ácidos nucleicos de modo que dos o más restos de aminoácidos que forman la interfaz de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera sean restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente entre sí. Preferentemente, los restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente entre sí son cualquier conjunto de restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en, por ejemplo, los conjuntos de restos de aminoácidos que se muestran en (a) y (b) a continuación:

(a) el resto de aminoácido contenido en la región variable de la cadena pesada en la posición 39 como se indica mediante la numeración de Kabat, y el resto de aminoácido contenido en la región variable de la cadena ligera en la posición 38 como se indica mediante la numeración de Kabat; o

(b) el resto de aminoácido contenido en la región variable de la cadena pesada en la posición 45 como se indica mediante la numeración de Kabat, y el resto de aminoácido contenido en la región variable de la cadena ligera en la posición 44 como se indica mediante la numeración de Kabat.

Los restos de aminoácidos mencionados anteriormente que se repelen eléctricamente entre sí se seleccionan preferentemente de los restos de aminoácidos contenidos en cualquiera de los conjuntos (X) e (Y) mencionados anteriormente.

Se proporciona otro método de producción, que incluye un método de producción de un anticuerpo en el que la asociación de la cadena pesada y la cadena ligera está regulada, que comprende:

(1) la modificación de los ácidos nucleicos que codifican CH1 y CL de modo que un conjunto o dos o más conjuntos de restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos mostrados en (a) a (c) a continuación se vuelvan restos de aminoácidos que no se repelen eléctricamente entre sí:

(a) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 180 como se indica mediante la numeración de EU;

(b) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 131 como se indica mediante la numeración de EU; y

(c) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 175 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 160 como se indica mediante la numeración de EU,

(2) la introducción de los ácidos nucleicos modificados en células hospedadoras y el cultivo de modo que las células hospedadoras expresen los ácidos nucleicos, y

(3) la recogida de un anticuerpo de un cultivo de las células hospedadoras.

Otro método de producción comprende adicionalmente, en la etapa (1) del método de producción mencionado anteriormente, la modificación de los ácidos nucleicos de modo que los restos de aminoácidos del conjunto de restos de aminoácidos mostrados en (d) a continuación se vuelvan restos de aminoácidos que no se repelen eléctricamente entre sí:

(d) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 213 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 123 como se indica mediante la numeración de EU.

Además, se proporciona un método de producción que comprende, en la etapa (1) mencionada anteriormente, la modificación de los ácidos nucleicos de modo que los restos de aminoácidos que no se repelen eléctricamente entre sí sean restos de aminoácidos seleccionados de cada uno de los dos conjuntos seleccionados del grupo que consiste en los (X) a (Z) mencionados anteriormente, y donde los dos conjuntos se seleccionan entre las combinaciones de (X) e (Y), (X) y (Z), (Y) y (Z), y (Z) y (Z).

Además, los ejemplos específicos de los restos de aminoácidos que no se repelen eléctricamente entre sí en la

etapa (1) mencionada anteriormente incluyen los siguientes restos de aminoácidos:

- el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 175 como se indica mediante la numeración de EU, que es lisina (K); y los restos de aminoácidos contenidos en CL en la posición 180, posición 131 y posición 160, como se indica mediante la numeración de EU, que son todos ácido glutámico (E); y
- los restos de aminoácidos contenidos en CH1 en la posición 147 y en la posición 175 como se indica mediante la numeración de EU, que son ácido glutámico (E), y los restos de aminoácidos contenidos en CL en la posición 180, posición 131 y posición 160, como se indica mediante la numeración de EU, que son todos lisina (K).

Además, en otro ejemplo, el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 213 como se indica mediante la numeración de EU es ácido glutámico (E), y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 123 como se indica mediante la numeración de EU es lisina (K).

Además, se proporciona un método de producción, que comprende en la etapa (1) mencionada anteriormente, la modificación de los ácidos nucleicos de modo que dos o más restos de aminoácidos que forman la interfaz de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera sean restos de aminoácidos que no se repelen eléctricamente entre sí. Preferentemente, los restos de aminoácidos que no se repelen eléctricamente entre sí son, por ejemplo, restos de aminoácidos de cualquier conjunto seleccionado del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos indicados en (a) y (b) a continuación:

- (a) el resto de aminoácido contenido en la región variable de la cadena pesada en la posición 39 como se indica mediante la numeración de Kabat, y el resto de aminoácido contenido en la región variable de la cadena ligera en la posición 38 como se indica mediante la numeración de Kabat; y
- (b) el resto de aminoácido contenido en la región variable de la cadena pesada en la posición 45 como se indica mediante la numeración de Kabat, y el resto de aminoácido contenido en la región variable de la cadena ligera en la posición 44 como se indica mediante la numeración de Kabat.

Los restos de aminoácidos mencionados anteriormente que no se repelen eléctricamente entre sí son preferentemente restos de aminoácidos seleccionados de cada uno de los dos conjuntos seleccionados del grupo que consiste en los mencionados anteriormente (X) a (Z), y donde los dos conjuntos se seleccionan entre las combinaciones de (X) e (Y), (X) y (Z), (Y) y (Z), y (Z) y (Z).

Además, la presente invención proporciona un método para regular la asociación de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de un anticuerpo como se define en las reivindicaciones.

Un método para regular la asociación de la presente invención es un método para regular la asociación de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de un anticuerpo como se define en las reivindicaciones, que comprende la modificación de los ácidos nucleicos de modo que un conjunto o dos o más conjuntos de restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos mostrados en (a) a (c) a continuación se vuelvan restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente entre sí:

- (a) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 180 como se indica mediante la numeración de EU;
- (b) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 131 como se indica mediante la numeración de EU; y
- (c) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 175 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 160 como se indica mediante la numeración de EU.

Otra realización de la presente invención proporciona dicho método para regular la asociación en un anticuerpo, que comprende adicionalmente la modificación de los ácidos nucleicos de modo que los restos de aminoácidos del conjunto de restos de aminoácidos mostrados en (d) a continuación sean restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente entre sí:

- (d) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 213 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 123 como se indica mediante la numeración de EU.

Adicionalmente, se proporciona un método para regular la asociación de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras de un anticuerpo, que comprende la modificación de los ácidos nucleicos de modo que un conjunto o dos o más conjuntos de restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos mostrados en (a) a (c) a continuación se vuelvan restos de aminoácidos que no se repelen eléctricamente entre sí:

- (a) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 180 como se indica mediante la numeración de EU;
- (b) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 131 como se indica mediante la numeración de EU; y
- (c) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 175 como se indica mediante la numeración de EU, y

el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 160 como se indica mediante la numeración de EU.

Adicionalmente se proporciona dicho método para regular la asociación en un anticuerpo, que comprende adicionalmente la modificación de los ácidos nucleicos de modo que los restos de aminoácidos del conjunto de
5 restos de aminoácidos indicados en (d) a continuación sean restos de aminoácidos que no se repelen eléctricamente entre sí:

(d) el resto de aminoácido contenido en CH1 en la posición 213 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido contenido en CL en la posición 123 como se indica mediante la numeración de EU.

10 De acuerdo con el método para regular la asociación de la presente invención, un anticuerpo biespecífico deseado puede obtenerse preferentemente y de forma eficaz como se describió previamente. En concreto, puede formarse de forma eficaz un multímero heteromérico deseado en forma de un anticuerpo biespecífico a partir de una mezcla de monómeros.

15 La frase "modificar ácidos nucleicos" se refiere a la modificación de los ácidos nucleicos para que se correspondan con los restos de aminoácidos introducidos por las "modificaciones" en el contexto de la presente invención. De manera más específica, se refiere a la modificación de los ácidos nucleicos que codifican los restos de aminoácidos originales (premodificados) a los ácidos nucleicos que codifican los restos de aminoácidos que deben introducirse mediante la modificación. Habitualmente, significa realizar manipulaciones genéticas o tratamientos de mutación que
20 darían como resultado al menos una inserción, delección o sustitución de nucleótido en el ácido nucleico original, de modo que se formen los codones que codifican los restos de aminoácidos de interés. De manera más específica, los codones que codifican los restos de aminoácidos originales se sustituyen por codones que codifican los restos de aminoácidos que se van a introducir mediante la modificación. Los expertos en la materia pueden realizar de forma adecuada dicha modificación de ácidos nucleicos usando técnicas conocidas, tales como mutagénesis dirigida y mutagénesis por PCR.

Además, la presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de la presente invención como se define en las reivindicaciones. Además, también se incluyen en la presente invención vectores que portan los ácidos nucleicos.

30 Habitualmente, los ácidos nucleicos de la presente invención son transportados por (están insertados en) vectores adecuados y luego se introducen en las células hospedadoras. Estos vectores no están particularmente limitados siempre y cuando el ácido nucleico insertado se mantenga de forma estable. Por ejemplo, cuando se utiliza *E. coli* como hospedador, el vector de clonación es preferentemente un vector pBluescript (Stratagene) y similar, pero se pueden usar diversos vectores disponibles en el mercado. Los vectores de expresión son particularmente útiles como vectores para producir los anticuerpos de la presente invención. Los vectores de expresión no están particularmente limitados siempre y cuando puedan expresar polipéptidos en tubos de ensayo, en *E. coli*, en células cultivadas o en organismos individuales. Por ejemplo, los vectores preferentes incluyen el vector pBEST (Promega) para la expresión en tubos de ensayo, el vector pET (Invitrogen) para *E. coli*, el vector pME18S-FL3 (N.º de referencia de GenBank AB009864) para células cultivadas y el vector pME18S (Mol. Cell Biol. 8:466-472 (1998)) para organismos individuales. La inserción de un ADN de la presente invención en vectores se puede realizar usando, por ejemplo, el kit In-Fusion Advantage PCR Cloning (Clontech).

45 Adicionalmente, la presente invención proporciona células hospedadoras que portan los ácidos nucleicos descritos anteriormente como se define en las reivindicaciones. Las células hospedadoras no están particularmente limitadas, y pueden utilizarse diversas células hospedadoras tales como *E. coli* y diversas células animales de acuerdo con el fin que se tenga. Las células hospedadoras pueden utilizarse, por ejemplo, como un sistema de producción para producir y expresar los anticuerpos o los polipéptidos de la presente invención o divulgación, respectivamente. Están disponibles para los sistemas de producción de polipéptidos sistemas de producción *in vitro* y *en vivo*. Son ejemplos de sistemas de producción *in vitro* los sistemas de producción que utilizan células eucarióticas o células procararióticas.

50 Las células eucarióticas que se pueden usar como células hospedadoras incluyen, por ejemplo, células animales, células vegetales y células fúngicas. Las células animales incluyen: células de mamífero, por ejemplo, CHO (J. Exp. Med. (1995) 108:945), COS, 3T3, de mieloma, BHK (riñón de hámster bebé), HeLa, C127, HEK293, células de melanoma de Bowes y Vero; células de anfibio tales como ovocitos de *Xenopus laevis* (Valle, *et al.* (1981) Nature 291:338-340); y células de insectos (por ejemplo, *Drosophila* S2, Sf9, Sf21 y Tn5). En la expresión de los anticuerpos de la presente invención, se pueden usar de manera adecuada células CHO-DG44, CHO-DX11B, COS7 y células BHK. Entre las células animales, las células CHO son particularmente preferentes para la expresión a gran escala.

60 Los vectores pueden introducirse en una célula hospedadora por métodos conocidos, por ejemplo, por métodos con fosfato de calcio, los métodos DEAE-dextrano, los métodos que utilizan liposomas catiónicos DOTAP (Boehringer-Mannheim), los métodos de electroporación (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel *et al.* (1987) Publish. John Wiley & Sons, Sección 9.1-9.9), lipofección, los métodos por lipofectamina (GIBCO-BRL) o los métodos por microinyección. Además, la introducción de genes para la expresión de polipéptidos también se puede

llevar a cabo utilizando el sistema de expresión Free Style 293 (Invitrogen).

Las células vegetales incluyen, por ejemplo, células obtenidas de *Nicotiana tabacum*, conocidas como sistema de producción de proteínas. Para producir los anticuerpos de la presente invención, a partir de estas células pueden cultivarse callos.

Los sistemas de expresión de proteínas conocidos son los que utilizan células fúngicas, incluidas las células de levadura, por ejemplo, células del género *Saccharomyces* tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pombe*; y células de hongos filamentosos, por ejemplo, células del género *Aspergilo* tales como *Aspergillus niger*. Estas células pueden usarse como hospedador para producir los anticuerpos de la presente invención.

Las células bacterianas se pueden utilizar en los sistemas de producción que utilizan células procarióticas. Los ejemplos de células bacterianas incluyen *Streptococcus*, *Staphylococcus*, en *E. coli*, *Streptomyces*, *Bacillus subtilis* así como la *E. coli* descrita anteriormente. Dichas células pueden usarse para producir los anticuerpos de la presente invención.

Cuando se produce un anticuerpo utilizando una célula hospedadora de la presente invención, el polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente invención puede expresarse cultivando las células hospedadoras transformadas con el vector de expresión que contiene el polinucleótido. El cultivo se puede realizar utilizando métodos conocidos. Por ejemplo, cuando se utilizan células animales como hospedador, se puede usar como medio de cultivo DMEM, MEM, RPMI 1640 o IMDM, y se puede usar con complementos de suero tales como SFB o suero fetal de ternera (SFT). Cultivos sin suero también son aceptables. Durante el curso del cultivo el pH preferente es de aproximadamente 6 a 8. El cultivo se lleva a cabo, normalmente, a aproximadamente 30 °C a 40 °C durante aproximadamente 15 a 200 horas. El medio se intercambia, se airea o agita, según sea necesario.

Por otro lado, pueden usarse como sistemas para producir polipéptidos *in vivo* sistemas de producción que utilizan animales o plantas. Se introduce un polinucleótido de interés en un animal o planta y el polipéptido se produce en el cuerpo del animal o planta, y después se recoge. El "hospedador" de la presente invención incluye tales animales y plantas.

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

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

Los animales que se utilizarán para el sistema de producción incluyen mamíferos e insectos. Se pueden usar mamíferos tales como cabras, cerdos, ovejas, ratones y ganado bovino (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications (1993)). Como alternativa, los mamíferos pueden ser animales transgénicos.

Por ejemplo, un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente invención puede prepararse como un gen de fusión con un gen que codifica un polipéptido producido específicamente en la leche, tal como la β -caseína de cabra. Los fragmentos de polinucleótido que contienen el gen de fusión se inyectan en embriones de cabra, que luego se introducen de nuevo en cabras hembra. El anticuerpo deseado se puede obtener de la leche producida por las cabras transgénicas, las cuales nacen de las cabras que recibieron los embriones, o de su descendencia. Se pueden administrar las hormonas apropiadas a las cabras transgénicas para aumentar el volumen de leche que contiene el anticuerpo producido por las mismas (Ebert *et al.*, Bio/Technology 12: 699-702 (1994)).

Para producir los anticuerpos de la presente invención pueden usarse también insectos tales como gusano de seda. Se pueden usar para infectar a los gusanos de seda baculovirus que llevan un polinucleótido que codifica un anticuerpo de interés, y el anticuerpo de interés se puede obtener a partir de sus líquidos corporales (Susumu *et al.*, Nature 315: 592-594 (1985)).

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

El anticuerpo resultante puede aislarse desde el interior o el exterior (tal como del medio y la leche) de las células hospedadoras, y purificarse como un anticuerpo sustancialmente puro y homogéneo. Los métodos no se limitan a ningún método específico y se puede usar cualquier método convencional de aislamiento y purificación de

anticuerpos. Los anticuerpos pueden aislarse y purificarse, seleccionando y combinando apropiadamente, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, columnas cromatográficas, filtración, ultrafiltración, desestabilización salina, precipitación con disolvente, extracción con disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, isoelectroenfoque, diálisis, recristalización, y otros.

Las cromatografías incluyen, por ejemplo, cromatografías de afinidad, cromatografías de intercambio iónico tales como cromatografías de intercambio aniónico y cromatografías de intercambio catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografías (de interacción) hidrófoba, filtraciones en gel, cromatografías de fase inversa, cromatografías de adsorción, cromatografías de hidroxapatita y cromatografías de lectina (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996). Estas cromatografías se pueden llevar a cabo utilizando cromatografías en fase líquida tales como HPLC y FPLC. Los ejemplos de las columnas de cromatografía de afinidad incluyen columnas de proteína A y columnas de proteína G. Los ejemplos de las columnas de proteínas A incluyen Hyper D, POROS y Sepharose F.F. (Pharmacia).

Un anticuerpo puede modificarse libremente y se pueden deleccionar porciones peptídicas de él tratando el anticuerpo con una enzima modificadora de proteínas apropiada, antes o después de la purificación del anticuerpo, según sea necesario. Dichas enzimas modificadoras de proteínas incluyen, por ejemplo, tripsinas, quimiotripsinas, lisil endopeptidasas, proteína quinasas y glucosidasas.

En otra realización preferente, la presente invención también incluye métodos para producir los anticuerpos de la presente invención, incluyendo tales métodos las etapas de cultivar las células hospedadoras de la presente invención como se describe anteriormente, y recoger los anticuerpos de dicho cultivo celular.

Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas (agentes farmacéuticos) que comprenden un anticuerpo de la presente invención y un transportador farmacéuticamente aceptable. En la presente invención, composiciones farmacéuticas se refieren habitualmente a agentes farmacéuticos para tratar o prevenir, o analizar y diagnosticar enfermedades.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden producir mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Además, los anticuerpos de la presente invención se pueden formular en combinación con otras sustancias farmacéuticas, según sea necesario. Por ejemplo, se pueden usar por vía parenteral en forma de inyección de una solución o suspensión estéril con agua u otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, pueden formularse como dosis unitarias que cumplan con los requisitos para la preparación de productos farmacéuticos, mediante la combinación apropiada con transportadores o medios farmacéuticamente aceptables, específicamente con agua estéril, solución salina fisiológica, un aceite vegetal, emulsionante, suspensión, detergente, estabilizante, agente saborizante, excipiente, vehículo, conservante, aglutinante o similar. En tales preparaciones, la cantidad de principio activo se ajusta de manera que la dosis se encuentre dentro de un intervalo predeterminado apropiado.

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

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

Los aceites incluyen aceites de sésamo y soja. Se pueden usar en combinación como solubilizantes el benzoato de bencilo y/o el alcohol bencílico. Además, se pueden combinar tampones (por ejemplo, tampón fosfato y tampón acetato de sodio), agentes calmantes (por ejemplo, clorhidrato de procaína), estabilizantes (por ejemplo, alcohol bencílico y fenol) y/o antioxidantes. Los inyectables preparados generalmente se cargan en ampollas apropiadas.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran preferentemente por vía parenteral. Por ejemplo, las composiciones pueden ser inyecciones, composiciones transnasales, composiciones transpulmonares o composiciones transdérmicas. Por ejemplo, tales composiciones pueden administrarse por vía sistémica o localmente mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea o similares.

Los métodos de administración pueden seleccionarse de forma apropiada teniendo en cuenta la edad y los síntomas del paciente. La dosis de una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo o un polinucleótido que codifica un anticuerpo puede seleccionarse, por ejemplo, de 0,0001 a 1000 mg/kg para cada administración. Como alternativa, la dosis puede ser, por ejemplo, de 0,001 a 100.000 mg por paciente. Sin embargo, las dosis no están necesariamente limitadas a los intervalos descritos anteriormente. Las dosis y los métodos de administración varían dependiendo del peso, la edad, síntomas y demás, del paciente. Los expertos en la materia pueden seleccionar las

dosis apropiadas y los métodos de administración teniendo en cuenta los factores descritos anteriormente.

Los aminoácidos contenidos en las secuencias de aminoácidos en el contexto de la presente invención pueden modificarse postraduccionalmente (por ejemplo, la modificación de una glutamina N-terminal para dar lugar a un ácido piroglutámico es bien conocida por los expertos en la materia). Naturalmente, tales aminoácidos modificados postraduccionalmente están incluidos en las secuencias de aminoácidos en el contexto de la presente invención.

Ejemplos

A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá de manera específica haciendo referencia a los ejemplos, aunque la presente invención no se limita a los mismos.

[Ejemplo 1] Búsqueda de sitios que regulen la interfaz de CH1/CL

Se pensó que al introducir mutaciones en cada uno de los dominios CH1 y CL de un anticuerpo biespecífico, y al utilizar la carga eléctrica en la interfaz de CH1/CL para regular la interfaz de CH1/CL, solo se asociarían específicamente la cadena H y la cadena L para un antígeno A, y solo se asociarían específicamente la cadena H y la cadena L para un antígeno B. En lo sucesivo en el presente documento, se denomina a esto regulación de la interfaz de CH1/CL. Se llevó a cabo una búsqueda utilizando un modelo de estructura cristalina para determinar las posiciones las que se puede controlar la interfaz de CH1/CL. Los aminoácidos mantienen las interacciones entre las cadenas laterales a través de la interacción hidrófoba, interacción eléctrica, enlaces de hidrógeno y similares. Se sabe que estas interacciones se producen entre las cadenas laterales presentes dentro de un límite de aproximadamente 4 Å. Por lo tanto, los aminoácidos se encontraron en un modelo de PDB 1HZH, en donde la distancia entre los aminoácidos presentes en CH1 y los aminoácidos presentes en CL en la interfaz entre CH1 y CL es de aproximadamente 4 Å. Los sitios en los que se encuentran los aminoácidos se resumen en la Fig. 1 y la Tabla 1 (Resumen de los sitios modificados). Los números de aminoácidos que se muestran en la Tabla 1 se indican de acuerdo con la numeración de EU (Sequences of proteins of immunological interest, publicación NIH N.º 91-3242). Además, los números de aminoácidos posteriores también se indican en conformidad con la numeración de EU. En el presente ejemplo, se usó la IgG1 para la cadena H y se usó la IgK (Kappa) para la cadena L.

[Tabla 1]

	CH	CL
1	K147	T180
2	Q175	Q160
3	K213	E123
4	K133	N138
5	K147	S131
6	H168	T164
7	F170	L135

Para regular la interfaz de CH1/CL utilizando la carga eléctrica de los aminoácidos, los aminoácidos encontrados en CH1 de la cadena H o en CL de la cadena L (Tabla 1) se sustituyeron por Lys o His cargados positivamente y Glu o Asp cargados negativamente. De manera más específica, regiones constantes: se prepararon TH2 y TH11, en las que aminoácidos de CH1 de G1d humana (SEQ ID NO: 1) se sustituyeron por Lys cargada positivamente; y TH1, TH3, TH4, TH9, TH10 y TH12, en las que aminoácidos de CH1 para G1d humana (SEQ ID NO: 1) se sustituyeron por Glu o Asp cargados negativamente. De forma similar, regiones constantes: se prepararon TL2, TL4, TL5, TL6, TL8 y TL12, en las que aminoácidos de la CL humana (SEQ ID NO: 13) se sustituyeron por Lys cargada positivamente; TL11, en la que aminoácidos de la CL humana (SEQ ID NO: 13) se sustituyeron por His, y TL1, TL3, TL7, TL9, TL10 y TL13, en las que aminoácidos de CL humana (SEQ ID NO: 13) se sustituyeron por Glu o Asp cargados negativamente. Los nombres (nombre), los sitios de mutación (mutación) y los números de secuencia de las regiones constantes preparadas se resumen en la Tabla 2 (Resumen de sitios modificados).

[Tabla 2]

CH1			CL		
nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO
TH1	K147E	SEQ ID NO: 002	TL1	T180E	SEQ ID NO: 014
TH2	Q175K	SEQ ID NO: 003	TL2	T180K	SEQ ID NO: 015
TH3	Q175E	SEQ ID NO: 004	TL3	Q160E	SEQ ID NO: 016
TH4	K213E	SEQ ID NO: 005	TL4	Q160K	SEQ ID NO: 017
TH9	K133E	SEQ ID NO: 006	TL5	E123K	SEQ ID NO: 018
TH10	H168D	SEQ ID NO: 007	TL6	N138K	SEQ ID NO: 019
TH11	F170K	SEQ ID NO: 008	TL7	N138E	SEQ ID NO: 020

(continuación)

CH1			CL		
nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO
TH12	F170E	SEQ ID NO: 009	TL8	S131K	SEQ ID NO: 021
			TL9	S131E	SEQ ID NO: 022
			TL10	T164D	SEQ ID NO: 023
			TL11	T164H	SEQ ID NO: 024
			TL12	L135K	SEQ ID NO: 025
			TL13	L135E	SEQ ID NO: 026

[Ejemplo 2] Método para seleccionar sitios que regulan la interfaz de CH1/CL, y preparación y análisis de cada anticuerpo

5 Los efectos sobre la regulación de la interfaz de CH1/CL de los aminoácidos encontrados se confirmaron utilizando el método que se describe a continuación. La selección se llevó a cabo utilizando un anticuerpo anti-GPC3. En primer lugar, se construyeron vectores de expresión de la cadena H y la cadena L. Un vector de expresión de la cadena H que tiene la región variable de la cadena H GpH7 (SEQ ID NO: 34) y la región constante de la cadena H preparada en el Ejemplo 1, y un vector de expresión de la cadena L que tiene la región variable de la cadena L GpL 16 (SEQ ID NO: 35) y la región constante de la cadena L preparada en el Ejemplo 1 se construyeron cada uno de acuerdo con el Ejemplo de Referencia 1. A continuación, se seleccionaron de la manera descrita a continuación combinaciones de los vectores de expresión de la cadena H y de la cadena L preparados. Se seleccionó entre las regiones constantes preparadas en el Ejemplo 1 una sola cadena H en la que el aminoácido en el sitio encontrado tiene una carga positiva o una carga negativa. En este caso, no siempre se introdujo una mutación. Por ejemplo, aunque la posición 147 de TH1 está sustituida por Glu, no se introduce una mutación porque el aminoácido en la posición 147 de G1d es Lys e inicialmente tiene una carga positiva. A continuación, las cadenas L, que tienen mutaciones en las posiciones correspondientes a las posiciones mutadas en CH1 de las cadenas H seleccionadas de acuerdo con la Tabla 1, se seleccionaron de la Tabla 2. Por ejemplo, cuando se selecciona TH1 para la cadena H, TL1 y TL2 se seleccionados para la cadena L, dado que se espera que el aminoácido en la posición 147 de CH1 y el aminoácido en la posición 180 de CL interactúen como la interfaz de CH1/CL. Posteriormente, las dos cadenas L seleccionadas se mezclaron con la cadena H seleccionada, y los anticuerpos se expresaron en conformidad con el Ejemplo de Referencia 1. Por último, los anticuerpos expresados se analizaron en conformidad con el Ejemplo de Referencia 3 o el Ejemplo de Referencia 4, y las modificaciones eficaces para regular la interfaz de CH1/CL se seleccionaron de acuerdo con la relación de expresión de cada anticuerpo. Dado que la IgG está compuesta por un complejo de dos cadenas H y dos cadenas L, cuando un tipo de cadena H y dos tipos de cadenas L se mezclan y expresan, se espera que se expresen tres combinaciones. Por ejemplo, cuando se expresan combinaciones de TH1 como la cadena H, y TL1 y TL2 como las cadenas L, se expresan las tres combinaciones siguientes (Fig. 2): cadena H_1:cadena H_2:cadena L_1:cadena L_2 = TH1:TH1:TL1:TL1 (indicado como TH1/TL1), cadena H_1:cadena H_2:cadena L_1:cadena L_2 = TH1:TH1:TL1:TL2 (indicado como TH1/TL1_TL2) cadena H_1:cadena H_2:cadena L_1:cadena L_2 = TH1:TH1:TL2:TL2 (indicado como TH1/TL2). En el caso en que la asociación de la cadena H y la cadena L no sea selectiva, se espera que la cadena H y las cadenas L se expresen en la relación TH1/TL1:TH1/TL1_TL2:TH1/TL2 = 1:2:1, dado que las dos cadenas L están presentes en cantidades iguales. Sin embargo, en el caso en que la cadena H se una preferentemente a solo una de las cadenas L en la interfaz de CH1/CL, se piensa que solo se expresa preferentemente esa combinación. Por ejemplo, en el caso en que el aminoácido en la posición 147 de CH1 y el aminoácido en la posición 180 de CL están implicados en la interfaz de CH1/CL, cuando TH1 se expresa como la cadena H, y TL1 y TL2 se expresan como las cadenas L, se espera que se exprese preferentemente la combinación de TH1, en la que el aminoácido en la posición 147 de CH1 es Glu (cargado negativamente) y TL2, en la que el aminoácido en la posición 180 del CL de la cadena L es Lys (cargado positivamente). Sin embargo, en el caso en que el aminoácido en la posición 147 de CH1 y el aminoácido en la posición 180 de CL no interactúan en la interfaz de CH1/CL, dado que la asociación de la cadena H y la cadena L no es selectiva, se espera que se expresen en la relación TH1/TL1:TH1/TL1_TL2:TH1/TL2 = 1:2:1. De esta manera, las modificaciones eficaces para la regulación de la interfaz de CH1/CL (modificaciones implicadas en la interfaz de CH1/CL) se seleccionaron mezclando y expresando un tipo de cadena H y dos tipos de cadenas L, y utilizando el equilibrio de expresión de la misma como indicador.

Las combinaciones de la cadena H y las cadenas L se resumen en la Tabla 3 (Combinaciones de la cadena H y las cadenas L utilizadas en la expresión; también se muestran los sitios de mutación en la cadena H y la cadena L).

[Tabla 3]

cad. H			cad. L		
nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO
G1d	K213K	SEQ ID NO: 001	TL1_TL2	T180E_T180K	SEQ ID NO: 014, SEQ ID NO: 015
TH1	K147E	SEQ ID NO: 002	TL1_TL2	T180E_T180K	SEQ ID NO: 014, SEQ ID NO: 015
TH2	Q175K	SEQ ID NO: 003	TL3_TL4	Q160E_Q160K	SEQ ID NO: 016, SEQ ID NO: 017

50

(continuación)

cad. H			cad. L		
TH3	Q175E	SEQ ID NO: 004	TL3_TL4	Q160E_Q160K	SEQ ID NO: 016, SEQ ID NO: 017
nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO
G1d	K213K	SEQ ID NO: 001	k0_TL5	E123E_E123K	SEQ ID NO: 013, SEQ ID NO: 018
TH4	K213E	SEQ ID NO: 005	k0_TL5	E123E_E123K	SEQ ID NO: 013, SEQ ID NO: 018
G1d	K213K	SEQ ID NO: 001	TL6_TL7	N138K_N138E	SEQ ID NO: 019, SEQ ID NO: 020
TH9	K133E	SEQ ID NO: 006	TL6_TL7	N138K_N138E	SEQ ID NO: 019, SEQ ID NO: 020
G1d	K213K	SEQ ID NO: 001	TL8_TL9	S131K_S131E	SEQ ID NO: 021, SEQ ID NO: 022
TH1	K147E	SEQ ID NO: 002	TL8_TL9	S131K_S131E	SEQ ID NO: 021, SEQ ID NO: 022
G1d	K213K	SEQ ID NO: 001	TL10_TL11	T164D_T164H	SEQ ID NO: 023, SEQ ID NO: 024
TH10	H168D	SEQ ID NO: 007	TL10_TL11	T164D_T164H	SEQ ID NO: 023, SEQ ID NO: 024
TH11	F170K	SEQ ID NO: 008	TL12_TL13	L135K_L135E	SEQ ID NO: 025, SEQ ID NO: 026
TH12	F170E	SEQ ID NO: 009	TL12_TL13	L135K_L135E	SEQ ID NO: 025, SEQ ID NO: 026

5 Los anticuerpos se expresaron en conformidad con las combinaciones mostradas en la Tabla 3, y se confirmaron los efectos sobre la regulación de la interfaz de CH1/CL seleccionada. En ese momento, los anticuerpos de un tipo de cadena H y un tipo de cadena L se expresaron simultáneamente y se utilizaron como control en los análisis. Los anticuerpos se expresaron en conformidad con el método del Ejemplo de Referencia 1.

10 Los anticuerpos preparados se analizaron por AIEX, en conformidad con el método del Ejemplo de Referencia 3. Los datos del análisis por AIEX se resumen en la Fig. 3. Dado que en el análisis por AIEX se utiliza una columna de intercambio aniónico, los anticuerpos cargados negativamente se eluyen más rápidamente. Los datos analizados se resumen y muestran en la Tabla 4. Los picos se indican como picos 1, 2 y 3 por orden de tiempo de elución creciente. La relación de cada pico se calculó con el total de las áreas de los picos siendo del 100 %.

15 Como se muestra en la Fig. 2, en el caso en que las posiciones en las que se introdujeron mutaciones forman una interacción eléctrica, la relación de anticuerpo en la posición del pico de color gris aumenta. En concreto, se cree que los sitios de mutación en los que la relación del anticuerpo de color gris es mayor del 25 % interactúan eléctricamente.

[Tabla 4]

cad. H		cad. L		pico 1	pico 2	pico 3
nombre	mutación	nombre	mutación	%	%	%
G1d	K213K	TL1	T180E			100
G1d	K213K	TL2	T180K	100		
G1d	K213K	TL1_TL2	T180E_T180K	35,6	44,2	20,2
TH1	K147E	TL1	T180E			100
TH1	K147E	TL2	T180K	100		
TH1	K147E	TL1.TL2	T180E_T180K	24,8	46,7	
TH2	Q175K	TL3	Q160E			100
TH2	G175K	TL4	Q160K	100		
TH2	Q175K	TL3_TL4	Q160E_Q160K	43	44	13
TH3	Q175E	TL3	Q160E			100
TH3	Q175E	TL4	G160K	100		
TH3	Q175E	TL3_TL4	Q160E_Q160K	24,8	49,9	
G1d	K213K	k0	E123E			100
G1d	K213K	TL5	E123K	100		
G1d	K213K	k0_TL5	E123E_E123K	45,6	39,3	15,1
TH4	K213E	k0	E123E			100
TH4	K213E	TL5	E123K	100		
TH4	K213E	k0_TL5	E123E_E123K	41,2	41,3	17,5
G1d	K213K	TL6	N138K	100		
G1d	K213K	TL7	N138E			100
G1d	K213K	TL6_TL7	N138K_N138E	27,3	44	28,7
TH9	K133E	TL6	N138K	100		
TH9	K133E	TL7	N138E			100
TH9	K133E	TL6_TL7	N138K_N138E	29,1	44	26,9
G1d	K213K	TL8	S131K	100		
G1d	K213K	TL9	S131E			100
G1d	K213K	TL8_TL9	S131K_S131E	17,8	45,7	

(continuación)

cad. H		cad. L		pico 1	pico 2	pico 3
nombre	mutación	nombre	mutación	%	%	%
TH1	K147E	TL8	S131K	100		
TH1	K147E	TL9	S131E			100
TH1	K147E	TL8_TL9	S131K_S131E	36,9	44,1	19
G1d	K213K	TL10	T164D	100		
G1d	K213K	TL11	T164H			100
G1d	K213K	TL10_TL11	T164D_T164H	27	43,3	29,7
TH10	H168D	TL10	T164D	100		
TH10	H168D	TL11	T164H			100
TH10	H168D	TL10_TL11	T164D_T164H	27	44,4	28,6
TH11	F170K	TL12	L135K	100		
TH11	F170K	TL13	L135E			100
TH11	F170K	TL12.TL13	L135K_L135E	no expresado		
TH12	F170E	TL12	L135K	100		
TH12	F170E	TL13	L135E			100
TH12	F170E	TL12.TL13	L135K_L135E	38,1	41,6	20,3

Como resultado de examinar diversos sitios de modificación de esta manera, las posiciones 147, 175 y 213 de la cadena H, y las posiciones 123, 131, 160 y 180 de la cadena L se consideraron eficaces para regular la interfaz de CH1/CL. Además, se descubrió que las modificaciones de solo la posición 147 de la cadena H y la posición 123 de la cadena L descritas en los documentos WO 2006/106905 y WO 2007/147901 eran inadecuadas para provocar una asociación específica de la cadena H y la cadena L, y la asociación específica es solo es posible combinando las modificaciones encontradas en el presente ejemplo.

[Ejemplo 3] Preparación y análisis de anticuerpos con los sitios de modificación combinados

Se pensó que la interfaz de CH1/CL se regula de forma más eficaz combinando los sitios de K147, Q175 y K213 en CH1 y los sitios de E123, S131, Q160 y T180 en CL, como se descubrió en el Ejemplo 2, los que se pensaba que tenían efectos considerables en la regulación de la interfaz de CH1/CL. Las combinaciones de modificaciones en los anticuerpos preparados y los anticuerpos expresados se resumen en la Tabla 5 (Resumen de los sitios de modificación).

[Tabla 5]

cad. H			cad. L		
nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO
G1d	K147K	SEQ ID NO: 001	TL14_TL15	T180K,S131K_T180E,S131E	SEQ ID NO: 027, SEQ ID NO: 028
TH1	K147E	SEQ ID NO: 002	TL14_TL15	T180K,S131K_T180E,S131E	SEQ ID NO: 027, SEQ ID NO: 028
TH2	Q175K	SEQ ID NO: 0031	TL16_TL17	T180K,S131K,Q160K_T180E,S131E,Q160E	SEQ ID NO: 029, SEQ ID NO:030
TH13	K147E,Q175E	SEQ ID NO: 010	TL16_TL17	T180K,S131K,Q160K_T180E,S131E,Q160E	SEQ ID NO: 029, SEQ ID NO: 030
G1d	K147K	SEQ ID NO: 001	TL18_TL15	T180K,S131K,E123K_T180E,S131E,E123E	SEQ ID NO: 031, SEQ ID NO: 028
TH14	K147E,K213E	SEQ ID NO: 011	TL18_TL15	T180K,S131K,E123K_T180E,S131E,E123E	SEQ ID NO: 031, SEQ ID NO: 028
TH2	Q175K	SEQ ID NO: 003	TL19_TL17	T180K,S131K,Q160K,E123K_T180E,S131E,Q160E	SEQ ID NO: 032, SEQ ID NO: 030
TH15	K147E,Q175E,K213E	SEQ ID NO: 012	TL19_TL17	T180K,S131K,Q160K,E123K_T180E,S131E,Q160E,E123E	SEQ ID NO: 032, SEQ ID NO: 030

La preparación de los vectores de expresión de la cadena H o la cadena L en las que se introdujeron mutaciones, y la expresión del anticuerpo, se llevaron a cabo en conformidad con el Ejemplo de Referencia 1, y los análisis de los anticuerpos preparados se llevaron a cabo en conformidad con el Ejemplo de Referencia 3 o con el Ejemplo de Referencia 4. Los resultados se resumen en la Tabla 6.

[Tabla 6]

cad. H		cad. L		pico 1	pico 2	pico 3
nombre	mutación	nombre	mutación	%	%	%
G1d	K147K	TL14	T180K,S131K	100		
G1d	K147K	TL15	T180E,S131E			100,0
G1d	K147K	TL14_TL15	T180K,S131K_T180E,S131E	11,5	43,6	44,9
TH1	K147E	TL14	T180K,S131K	100,0		
TH1	K147E	TL15	T180E,S131E			100,0
TH1	K147E	TL14_TL15	T180K,S131K_T180E,S131E	46,1	43,4	10,4
TH2	Q175K	TL16	T180K,S131K,Q160K	no expresado		
TH2	Q175K	TL17	T180E,S131E,Q160E			100,0
TH2	Q175K	TL16_TL17	T180K,S131K,Q160K_T180E,S131E,Q160E	1,4	16,5	82,0
TH13	K147E,Q175E	TL16	T180K,S131K,Q160K	100,0		
TH13	K147E,Q175E	TL17	T180E,S131E,Q160E			no expresado
TH13	K147E,Q175E	TL16_TL17	T180K,S131K,Q160K_T180E,S131E,Q160E	70,2	26,4	3,4
G1d	K147K	TL18	T180K,S131K,E123K	no expresado		
G1d	K147K	TL15	T180E,S131E			100,0
G1d	K147K	TL18_TL15	T180K,S131K,E123K_T180E,S131E,E123E	5,1	35,3	59,6
TH14	K147E.K213E	TL18	T180K,S131K,E123K	100,0		
TH14	K147E,K213E	TL15	T180E,S131E			100,0
TH14	K147E.K213E	TL18_TL15	T180K,S131K,E123K_T180E,S131E,E123E	44,5	44,4	11,1
TH2	Q175K	TL19	T180K,S131K,Q160K,E123K	no expresado		
TH2	Q175K	TL17	T180E,S131E,Q160E			100,0
TH2	Q175K	TL19_TL17	T180K,S131K,Q160K,E123K_T180E,S131E,Q160E,			93,1
TH15	K147E,Q175E,K213E	TL19	T180K,S131K,Q160K,E123K	100,0		
TH15	K147E,Q175E,K213E	TL17	T180E,S131E,Q160E			no expresado
TH15	K147E,Q175E,K213E	TL19_TL17	T180K,S131K,Q160K,E123K_T180E,S131E,Q160E	78,1	19,9	2,0

5 Cuando se comparan la Tabla 4 y la Tabla 6, se entiende que la relación de combinaciones que se tenían como objetivo de la cadena H y la cadena L aumenta por la combinación de modificaciones, en comparación con la introducción de una sola modificación. Como consecuencia, se cree que mediante la combinación de modificaciones puede prepararse de forma eficaz un anticuerpo en el que se han asociado solo la cadena H y la cadena L de interés.

10 [Ejemplo 4] Expresión y análisis de anticuerpos biespecíficos

En el ejemplo 3, se consideró la preparación de anticuerpos biespecíficos (Ac biespecíficos) para TH2, TH13 y TH15 de las cadenas H, y TL16, TL17, TL19 y TL20 de las cadenas L, que mostraron efectos considerables para regular la interfaz de CH1/CL. En este ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se prepararon utilizando un anticuerpo anti-IL6R y un anticuerpo anti-GPC3.

15 Las regiones constantes de la cadena H (SEQ ID NO: 59) y la cadena L (SEQ ID NO: 60) que reconocen anti-IL6R, y las regiones constantes de la cadena H (SEC ID NO: 61) y la cadena L (SEC ID NO: 62) que reconocen anti-GPC3 se sustituyeron por TH2, TH13 y TH15, para las regiones constantes de la cadena H, y por TL16, TL17, TL19 y TL20 para el CL de la cadena L. Además, se preparó una cadena H en la que se introdujo una modificación de "botón en ojal" (KiH, forma sigla del inglés *knob into hole*, botón en ojal) (documento WO 96/27011) para evitar la asociación entre cadenas H homogéneas. Los sitios de mutación en estos anticuerpos preparados y los anticuerpos expresados se resumen en la Tabla 7 (Combinaciones de cadena H y cadena L de cada anticuerpo biespecífico).

[Tabla 7]

NOMBRE	cad. A				cad. B				comentario
	VH	CH	VL	CL	VH	CH	VL	CL	
4ch_001	MH0	G1d	ML0	K0	GpH7	G1d	GpL16	k0	
4ch_002	MH0	G1dk	ML0	K0	GpH7	G1dh	GpL16	K0	KiH
4ch_003	MH0	TH2	ML0	TL17	GpH7	TH13	GpL16	TL16	CH1/CL_1
4ch_004	MH0	TH2k	ML0	TL17	GpH7	TH13h	GpL16	TL16	KiH+CH1/CL_1
4ch_011	MH0	TH2k	ML0	TL17	GpH7	TH13h	ML0	TL17	
4ch_012	MH0	TH2k	GpL16	TL16	GpH7	TH13h	GpL16	TL16	
4ch_005	MH0	TH2	ML0	TL17	GpH7	TH15	GpL16	TL19	CH1/CL_2
4ch_006	MH0	TH2k	ML0	TL17	GpH7	TH15h	GpL16	TL19	KiH+CH1/CL_2
4ch_015	MH0	TH2k	ML0	TL17	GpH7	TH15h	ML0	TL17	
4ch_016	MH0	TH2k	GpL16	TL19	GpH7	TH15h	GpL16	TL19	
4ch_001	MH0	G1d	ML0	K0	GpH7	G1d	GpL16	K0	
4ch_002	MH0	G1dk	ML0	K0	GpH7	G1dh	GpL16	K0	KiH
4ch_007	MH0	TH13	ML0	TL16	GpH7	TH2	GpL16	TL17	CH1/CL_1
4ch_008	MH0	TH13k	ML0	TL16	GpH7	TH2h	GpL16	TL17	KiH+CH1/CL_1
4ch_013	MH0	TH13k	ML0	TL16	GpH7	TH2h	ML0	TL16	
4ch_014	MH0	TH13k	GpL16	TL17	GpH7	TH2h	GpL16	TL17	
4ch_009	MH0	TH15	ML0	TL19	GpH7	TH2	GpL16	TL17	CH1/CL_2
4ch_010	MH0	TH15k	ML0	TL19	GpH7	TH2h	GpL16	TL17	KiH+CH1/CL_2
4ch_017	MH0	TH15k	ML0	TL19	GpH7	TH2h	ML0	TL19	
4ch_018	MH0	TH15k	GpL16	TL17	GdH7	TH2h	GpL16	TL17	

- 5 En la tabla 7 anterior, "k" se añade después del nombre de la variante para las regiones constantes en las que se introdujo una modificación de "botón" en la cadena H, y se añade "h" después del nombre de la variante para las regiones constantes en las que se introdujo una modificación de "ojal". Por ejemplo, "TH1k" indica que se introdujo una modificación de "botón" además de la mutación TH1, y "TH1h" indica que se introdujo una modificación de "ojal" además de la mutación TH1. La preparación de los vectores de expresión de la cadena H o la cadena L en las que se ha introducido una mutación, así como la expresión de los anticuerpos, se llevaron a cabo en conformidad con el
- 10 Ejemplo de referencia 1, y los análisis de los anticuerpos preparados se llevaron a cabo en conformidad con el método de análisis por CIEX mostrado en el Ejemplo de Referencia 4.

Las combinaciones de las cadenas H y las cadenas L del anticuerpo anti-IL6R y el anticuerpo anti-GPC3 utilizadas en los anticuerpos biespecíficos se resumen en la Tabla 8.

15

[Tabla 8]

NOMBRE	cadena	VH			CH			VL			CL		
		nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO
4ch_001	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	G1d	K147K	SEQ ID NO: 001	ML0	-	SEQ ID NO: 037	k0	-	SEQ ID NO: 013
4ch_002	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	G1dk	-	SEQ ID NO: 038	ML0	-	SEQ ID NO: 037	K0	-	SEQ ID NO: 013
4ch_003	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	TH2	Q175K	SEQ ID NO: 003	ML0	-	SEQ ID NO: 037	TL17	T180E, S131E, Q160E	SEQ ID NO: 030
4ch_004	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	TH2k	Q175K	SEQ ID NO: 039	ML0	-	SEQ ID NO: 037	TL17	T180E, S131E, Q160E	SEQ ID NO: 030
4ch_011	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	TH2k	Q175K	SEQ ID NO: 039	ML0	-	SEQ ID NO: 037	TL17	T180E, S131E, Q160E	SEQ ID NO: 030
4ch_012	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	TH2k	Q175K	SEQ ID NO: 039	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	TL16	T180K, S131K, Q160K	SEQ ID NO: 029
4ch_005	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	TH2	Q175K	SEQ ID NO: 003	ML0	-	SEQ ID NO: 037	TL17	T180E, S131E, Q160E	SEQ ID NO: 030

(continuación)

NOMBRE	cadena	VH			CH			VL			CL		
		nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO
4ch_006	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	TH2k	Q175K	SEQ ID NO: 039	ML0	-	SEQ ID NO: 037	TL17	T180E, S131E, Q160E	SEQ ID NO: 030
4ch_015	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	TH2k	Q175K	SEQ ID NO: 039	ML0	-	SEQ ID NO: 037	TL17	T180E, S131E, Q160E	SEQ ID NO: 030
4ch_016	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	TH2k	Q175K	SEQ ID NO: 039	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	TL19	T180K, S131, K, Q160K, E1 23K	SEQ ID NO: 032
4ch_001	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	G1d	K147K	SEQ ID NO: 001	ML0	-	SEQ ID NO: 037	K0	-	SEQ ID NO: 013
4ch_002	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	G1dk	-	SEQ ID NO: 038	ML0	-	SEQ ID NO: 037	K0	-	SEQ ID NO: 013
4ch_007	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	TH13	K147E, Q175E	SEQ ID NO: 010	ML0	-	SEQ ID NO: 037	TL16	T180K, S131 K, Q160K	SEQ ID NO: 029
4ch_008	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	TH13k	K147E, Q175E	SEQ ID NO: 040	ML0	-	SEQ ID NO: 037	TL16	T180K, S131 K, Q160K	SEQ ID NO: 029
4ch_013	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	TH13k	K147E, Q175E	SEQ ID NO: 040	ML0	-	SEQ ID NO: 037	TL16	T180K, S131 K, Q160K	SEQ ID NO: 029

(continuación)

NOMBRE	cadena	VH			CH			VL			CL		
		nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO
Ach_014	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	TH13k	K147E,Q175E	SEQ ID NO: 040	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	TL17	T180E,S131E,Q160E	SEQ ID NO: 030
4ch_009	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	TH15	K147E,Q175E,K213E	SEQ ID NO: 012	ML0	-	SEQ ID NO: 037	TL19	T180K,S131K,Q160K,E123K	SEQ ID NO: 032
4ch_010	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	TH15k	K147E,Q175E,K213E	SEQ ID NO: 041	ML0	-	SEQ ID NO: 037	TL19	T180K,S131K,Q160K,E123K	SEQ ID NO: 032
4ch_017	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	TH15k	K147E,Q175E,K213E	SEQ ID NO: 041	ML0	-	SEQ ID NO: 037	TL19	T180K,S131K,Q160K,E123K	SEQ ID NO: 032
4ch_018	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	TH15k	K147E,Q175E,K213E	SEQ ID NO: 041	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	TL17	T180E,S131E,Q160E	SEQ ID NO: 030
4ch_001	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	G1d	K147K	SEQ ID NO: 001	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	k0	-	SEQ ID NO: 013
4ch_002	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	G1dh	-	SEQ ID NO: 042	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	k0	-	SEQ ID NO: 013
4ch_003	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	TH13	K147E,Q175E	SEQ ID NO: 010	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	TL16	T180K,S131K,Q160K	SEQ ID NO: 029

(continuación)

NOMBRE	cadena	VH			CH			VL			CL		
		nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO
4ch_004	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	TH13h	K147E,Q175E	SEQ ID NO: 044	GpL16		SEQ ID NO: 03b	TL16	T180K,S131K,Q160K	SEQ ID NO: 029
4ch_011	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	TH13h	K147E,Q175E	SEQ ID NO: 044	ML0	-	SEQ ID NO: 037	TL17	T180E,S131E,Q160E	SEQ ID NO: 030
4ch_012	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	TH13h	K147E,Q175E	SEQ ID NO: 044	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	TL16	T180K,S131K,Q160K	SEQ ID NO: 029
4ch_005	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	TH15	K147E,Q175E,K213E	SEQ ID NO: 012	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	TL19	T180K,S131K,Q160K,E123K	SEQ ID NO: 032
4ch_006	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	TH15h	K147E,Q175E,K213E	SEQ ID NO: 045	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	TL19	T180K,S131K,Q160K,E123K	SEQ ID NO: 032
4ch_015	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	TH15h	K147E,Q175E,K213E	SEQ ID NO: 045	ML0	-	SEQ ID NO: 037	TL17	T180E,S131E,Q160E	SEQ ID NO: 030
4ch_016	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	TH15h	K147E,Q175E,K213E	SEQ ID NO: 045	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	TL19	T180K,S131K,Q160K,E123K	SEQ ID NO: 032
4ch_001	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	G1d	K147K	SEQ ID NO: 001	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	K0	-	SEQ ID NO: 013

(continuación)

NOMBRE	cadena	VH			CH			VL			CL		
		nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO
4ch_002	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	G1dh	-	SEQ ID NO: 042	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	K0	-	SEQ ID NO: 013
4ch_007	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	TH2	Q175K	SEQ ID NO: 003	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	TL17	T180E,S131E,Q160E	SEQ ID NO: 030
4ch_008	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	TH2h	Q175K	SEQ ID NO: 043	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	TL17	T180E,S131E,Q160E	SEQ ID NO: 030
4ch_013	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	TH2h	Q175K	SEQ ID NO: 043	ML0	-	SEQ ID NO: 037	TL16	T180K,S131K,Q160K	SEQ ID NO: 029
4ch_014	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	TH2h	Q175K	SEQ ID NO: 043	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	TL17	T180E,S131E,Q160E	SEQ ID NO: 030
4ch_009	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	TH2	Q175K	SEQ ID NO: 003	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	TL17	T180E,S131E,Q160E	SEQ ID NO: 030
4ch_010	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	TH2h	Q175K	SEQ ID NO: 043	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	TL17	T180E,S131E,Q160E	SEQ ID NO: 030
4ch_017	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	TH2h	Q175K	SEQ ID NO: 043	ML0	-	SEQ ID NO: 037	TL19	T180K,S131K,Q160K,E123K	SEQ ID NO: 032
4ch_018	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	TH2h	Q175K	SEQ ID NO: 043	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	TL17	T180E,S131E,Q160E	SEQ ID NO: 030

Cada combinación se explica en el presente documento utilizando 4ch_001, 4ch_002, 4ch_003, 4ch_004, 4ch_011 y 4ch_012 como ejemplos. Las modificaciones que regulan la interfaz de CH1/CL se resumen en la Tabla 8.

5 4ch_001 se expresó utilizando las cadenas H y L que no tienen la introducción de modificaciones para regular la interfaz de CH1/CL y la modificación KiH. 4ch_002 se expresó utilizando las cadenas H y la cadena L en las que se introdujo la modificación KiH. 4ch_003 se expresó utilizando las cadenas H y las cadenas L en las que se introdujo la modificación para regular la interfaz de CH1/CL. 4ch_004 se expresó utilizando las cadenas H y unas cadenas L en las que se introdujeron la modificación KiH y las modificaciones para regular la interfaz de CH1/CL. Además, 10 4ch_011 se expresó utilizando las cadenas H de un anticuerpo anti-IL6R y las cadenas H de un anticuerpo anti-GPC3 en las que se introdujeron la modificación de KiH y las modificaciones para regular la interfaz de CH1/CL, y las cadenas L de un anticuerpo anti-IL6R en las que se introdujeron las modificaciones para regular la interfaz de CH1/CL. 4ch_012 se expresó utilizando las cadenas H de un anticuerpo anti-IL6R y las cadenas H de un anticuerpo anti-GPC3 en las que se introdujeron la modificación de KiH y las modificaciones para regular la interfaz de CH1/CL, y las cadenas L de un anticuerpo anti-GPC3 en las que se introdujeron las modificaciones para regular la interfaz de CH1/CL. Cada anticuerpo se expresó en conformidad con el Ejemplo de Referencia 1 y se analizó por CIEEX en conformidad con el Ejemplo de Referencia 4; y los resultados se resumen en las Fig. 9-1 y 9-2. El caso de uso de la región variable de la cadena H de un anticuerpo anti-IL6R se indica con MH0, y el caso del uso de la región variable de la cadena H de un anticuerpo anti-GPC3 se indica con GpH7. El caso de uso de la región variable de la cadena L de un anticuerpo anti-IL6R se indica con ML0, y el caso del uso de la región variable de la cadena L de un anticuerpo anti-GPC3 se indica con GpL16. Se detectaron por cromatografía múltiples componentes heterogéneos para 4ch_001, al que no se introdujeron las mutaciones para el control de la interfaz de CH1/CL y KiH, los cuales se cree que son diversas combinaciones de cadena H y cadena L. Por el contrario, dado que la asociación de cadenas H homogéneas se suprimió en 4ch_002 con la mutación KiH, el número de picos cromatográficos que se cree que son impurezas se reduce. Además, dado que la asociación de las cadenas H y las cadenas L se suprimió en 4ch_003, que utiliza TH2 y TH13 en las cadenas H y TL16 y TL17 en las cadenas L, en donde se introdujeron modificaciones para regular la interfaz de CH1/CL, el número de picos de cromatografía que se cree que representan impurezas se reduce. Además, se reveló que 4ch_004, que combina las mutaciones de KiH y las modificaciones para regular la interfaz de CH1/CL, es principalmente el pico principal. Se piensa que la razón por la que los picos de cromatografía de 4ch_004 casi coinciden con los picos de cromatografía de 4ch_011 es que sus picos no pueden separarse por cromatografía debido a sus puntos isoeléctricos (pI) similares. Los estudios también se realizaron en 4ch_005, 4ch_006, 4ch_015 y 4ch_016, en que se aplicó una regulación de la interfaz de CH1/CL distinta de la de 4ch_004; 4ch_007, 4ch_008, 4ch_013 y 4ch_014, en los que las modificaciones para regular la interfaz de CH1/CL introducidas en 4ch_004 se intercambiaron entre el anticuerpo anti-GPC3 y el anticuerpo anti-IL6R; y 4ch_009, 4ch_010, 4ch_017 y 4ch_018, en los que las modificaciones para regular la interfaz de CH1/CL introducidas en 4ch_006 se intercambiaron entre el anticuerpo anti-GPC3 y el anticuerpo anti-IL6R, utilizando los mismos métodos que para 4ch_003, 4ch_004, 4ch_011 para 4ch_012. Como resultado, los componentes heterogéneos presentados en el cromatograma se redujeron significativamente en comparación con 4ch_001.

40 A partir de lo anterior, se hizo evidente que los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar de forma eficaz combinando las modificaciones para regular la interfaz de CH1/CL y la modificación KiH.

[Ejemplo 5] Efectos de la modificación de la regulación de la interfaz de CH1/CL utilizando distintos anticuerpos

45 Se hizo evidente a partir del Ejemplo 4 que la regulación de la interfaz que utiliza CH1/CL es útil para preparar anticuerpos biespecíficos. Por lo tanto, el efecto de la regulación de la interfaz de CH1/CL se confirmó utilizando un anticuerpo anti-CD3, M12 (cadena H: SEQ ID NO: 54, cadena L: SEQ ID NO: 57) y un anticuerpo anti-GPC3, GC33(2) (cadena H: SEQ ID NO: 55, cadena L: SEQ ID NO: 58). Como en el ejemplo 4, los anticuerpos biespecíficos se prepararon utilizando TH2, TH13 y TH15 en las cadenas H, y TL16, TL17 y TL19 en las cadenas L que demostraron efectos considerables para regular la interfaz de CH1/CL.

50 Las regiones constantes de la cadena H (SEQ ID NO: 54) y la cadena L (SEQ ID NO: 57) del anticuerpo que reconoce CD3 M12, y las regiones constantes de la cadena H (SEQ ID NO: 55) y la cadena L (SEQ ID NO: 58) del anticuerpo que reconoce GPC3 GC33(2) se sustituyeron por TH2, TH13 y TH15, para CH1 de la cadena H, y por TL16, TL17 y TL19 para el CL de la cadena L. Además, se preparó una cadena H con modificaciones de "botón en ojal" (KiH) (documento de patente 1) para evitar la asociación entre cadenas H homogéneas. Los sitios de mutación de estos anticuerpos preparados y los anticuerpos expresados se resumen en la Tabla 9 (Resumen de los sitios de modificación).

[Tabla 9]

NOMBRE	cad. A				cad. B			
	VH	CH	VL	CL	VH	CH	VL	CL
4ch_001	M12VH	G1d	M12VL	k0	GC33(2)VH	G1d	GC33(2)VL	k0
4ch_004	M12VH	TH2k	M12VL	TL17	GC33(2)VH	TH13h	GC33(2)VL	TL16
4ch_006	M12VH	TH2k	M12VL	TL17	GC33(2)VH	TH15h	GC33(2)VL	TL19
4ch_001	MH0	G1d	MLO	k0	GpH7	G1d	GpL16	k0
4ch_008	MH0	TH13k	MLO	TL16	GpH7	TH2h	GpL16	TL17
4ch_010	MH0	TH15k	MLO	TL19	GdH7	TH2h	GpL16	TL17

NOMBRE	cadena	VH		CH		VL		CL	
		mutación	SEQ ID NO	mutación	SEQ ID NO	mutación	SEQ ID NO	mutación	SEQ ID NO
4ch_001	cad. A		SEQ ID NO: 054	E9CH	L234A,L235A,N297A	M12VL	SEQ ID NO: 056	M12VL	SEQ ID NO: 013
4ch_004	cad. A	-	SEQ ID NO: 054	TH2k	Q175K	M12VL	SEQ ID NO: 039	M12VL	SEQ ID NO: 030
4ch_006	cad. A	-	SEQ ID NO: 054	TH2k	Q175K	M12VL	SEQ ID NO: 039	M12VL	SEQ ID NO: 030
4ch_001	cad. A	-	SEQ ID NO: 036	E9CH	L234A,L235A,N297A	MLO	SEQ ID NO: 056	MLO	SEQ ID NO: 013
4ch_008	cad. A		SEQ ID NO: 036	TH13k	K147E,Q175E	MLO	SEQ ID NO: 040	MLO	SEQ ID NO: 029
4ch_001	cad. A	-	SEQ ID NO: 036	TH15k	K147E,Q175E,K213E	MLO	SEQ ID NO: 041	MLO	SEQ ID NO: 032
4ch_001	cad. B	-	SEQ ID NO: 055	E9CH	L234A,L235A,N297A	GC33(2)VL	SEQ ID NO: 056	GC33(2)VL	SEQ ID NO: 013
4ch_004	cad. B	-	SEQ ID NO: 055	TH13h	K147E,Q175E	GC33(2)VL	SEQ ID NO: 044	GC33(2)VL	SEQ ID NO: 029
4ch_006	cad. B		SEQ ID NO: 055	TH15h	K147E,Q175E,K213E	GC33(2)VL	SEQ ID NO: 045	GC33(2)VL	SEQ ID NO: 032
4ch_001	cad. B	-	SEQ ID NO: 034	E9CH	L234A,L235A,N297A	GpL16	SEQ ID NO: 056	GpL16	SEQ ID NO: 013
4ch_008	cad. B	-	SEQ ID NO: 034	TH2h	Q175K	GpL16	SEQ ID NO: 043	GpL16	SEQ ID NO: 030
			SEQ ID NO: 034	TH2h	Q175K	GpL16	SEQ ID NO: 043	GpL16	SEQ ID NO: 030

La preparación de los vectores de expresión de las cadenas H y las cadenas L con mutaciones y la expresión de los anticuerpos se llevaron a cabo en conformidad con el Ejemplo de Referencia 1, y los análisis de los anticuerpos preparados se llevaron a cabo en conformidad con el método de análisis por CIEX mostrado en el Ejemplo de Referencia 4.

5 Es evidente que la regulación de la interfaz de CH1/CL también es útil para preparar anticuerpos biespecíficos con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-GPC3.

10 [Ejemplo 6] Combinación de la regulación de la interfaz de CH1/CL y regulación de la interfaz de las regiones variables

15 Cuando se preparan anticuerpos biespecíficos, la introducción de la repulsión eléctrica en las regiones variables VH y VL se conoce como una técnica para permitir la asociación específica de las cadenas H y las cadenas L que se tienen como objetivo (documento de patente WO 2006/106905). Por lo tanto, para expresar de forma eficaz solo los componentes que se tienen como objetivo, se debe provocar una repulsión entre las regiones variables de la cadena H y la cadena L, además de la regulación de la interfaz de CH1/CL. Esto se denomina regulación de interfaz de VH/VL. Se prepararon MH01 (SEQ ID NO: 46), en que la Gln en la posición 39 como se indica mediante la numeración de Kabat de la cadena H del anti-IL6R se sustituyó por Lys; MH02 (SEC ID NO: 47), en que la Gln se sustituyó por Glu; ML01 (SEQ ID NO: 50), en que la Gln en la posición 38 como se indica mediante la numeración de Kabat de la cadena L se sustituyó por Glu y ML02 (SEC ID NO: 51), en que la Glu se sustituyó por Lys. Además, se prepararon, respectivamente, GpH71 (SEQ ID NO: 48), en que la Gln en la posición 39 como se indica mediante la numeración de Kabat de la cadena H del anti-GPC3 se sustituyó por Lys; GpH72 (SEC ID NO: 49), en que la Gln se sustituyó por Glu; GpL161 (SEQ ID NO: 52), en que la Gln en la posición 38 como se indica mediante la numeración de Kabat de la cadena L se sustituyó por Glu y GpL162 (SEC ID NO: 53), en que la Glu se sustituyó por Lys. La preparación de los vectores de expresión de los anticuerpos se llevó a cabo en conformidad con el método del Ejemplo de referencia 1. Los anticuerpos biespecíficos se expresaron usando los anticuerpos preparados. Las combinaciones de modificaciones en los anticuerpos preparados y los anticuerpos expresados se resumen en la Tabla 10.

[Tabla 10]

NOMBRE	cadena	VH			CH			VL			CL		
		nombre	mutación	SEQ_ID NO	nombre	mutación	SEQ_ID NO	nombre	mutación	SEQ_ID NO	nombre	mutación	SEQ_ID NO
4ch_1,2_004	cad. A	MH01	Q39K	46	TH2k	Q175K	39	ML01	Q38E	50	TL17	T180E,S131E,Q160E	30
4ch_1,2_006	cad. A	MH01	Q39K	46	TH2k	Q175K	39	ML01	Q38E	50	TL17	T180E,S131E,Q160E	30
4ch_2,1_008	cad. A	MH02	Q39E	47	TH13k	K147E,Q175E	40	ML02	Q38K	51	TL16	T180K,S131K,Q160K	29
4ch_2,1_010	cad. A	MH02	Q39E	47	TH15k	K147E,Q175E,K213E	41	ML02	Q38K	51	TL19	T180K,S131K,Q160K,E123K	32
4ch_1,2_004	cad. B	GdH72	Q39E	49	TH13h	K147E,Q175E	44	GpL162	Q38K	53	TL16	T180K,S131K,Q160K	29
4ch_1,2_006	cad. B	GdH72	Q39E	49	TH15h	K147E,Q175E,K213E	45	GpL162	Q38K	53	TL19	T180K,S131K,Q160K,E123K	32
4ch_2,1_008	cad. B	GpH71	Q39K	48	TH2h	Q175K	43	GpL161	Q38E	52	TL17	T180E,S131E,Q160E	30
4ch_2,1_010	cad. B	GoH71	Q39K	48	TH2h	Q175K	43	GpL161	G38E	52	TL17	T180E,S131E,Q160E	30

La expresión de los anticuerpos se llevó a cabo en conformidad con el Ejemplo de Referencia 1, y los análisis de los anticuerpos preparados se llevaron a cabo en conformidad con el Ejemplo de Referencia 4.

5 Dado que los picos observados en los cromatogramas de 4ch_006 y 4ch_008, en los que se habían introducido mutaciones para regular la interfaz de CH1/CL, los cuales se cree que representan componentes heterogéneos, había desaparecido en 4ch_1,2_006 y 4ch_2,1_008 en los que se habían introducido mutaciones para regular la interfaz de VH/VL, se hizo evidente que solo los componentes que se tenían como objetivo pueden prepararse de forma eficaz aplicando la regulación de la interfaz de VH/VL además de la regulación de la interfaz de CH1/CL (Fig. 10 y 11). Además, los picos, que se cree que representan nuevos componentes heterogéneos, no se detectaban incluso si se realizaban mutaciones adicionales para regular la interfaz de VH/VL en 4ch_004 y 4ch_010, que tenía mutaciones introducidas solo en CH1/CL, y en los que se consideraron como purificados solo los componentes que se consideraron componentes objetivo (Fig. 10 y 11).

15 A partir de lo anterior, se hizo evidente que la adición de la regulación de la interfaz de VH/VL a la regulación de la interfaz de CH1/CL, facilita adicionalmente la purificación de los componentes que se tenían como objetivo, mientras que no tiene un efecto perjudicial sobre la purificación cuando solo se piensa que los componentes objetivo ya están purificados.

20 [Ejemplo 7] Medición de la Tm de los anticuerpos con sitios de modificación combinados

Las modificaciones para regular la interfaz de CH1/CL pueden tener un efecto sobre la estabilidad del Fab. Por lo tanto, se midió la estabilidad del Fab o la Tm en conformidad con el método del Ejemplo de Referencia 2, para las combinaciones de TH2/TL17, TH13/TL16 y TH1 5/TL19. Usando un anticuerpo anti-IL6R se prepararon anticuerpos en los que la cadena H/cadena L consistía en TH2/TL17, TH13/TL16 y TH15/TL19. Las combinaciones de modificaciones de anticuerpos y los anticuerpos expresados se resumen en la Tabla 11.

[Tabla 11]

cad. H			cad. L			Tm
nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO	
G1d	-	1	k0	-	13	95,0
TH2	Q175K	3	TL17	T180E,S131E,Q160E	30	93,1
TH13	K147E,Q175E	10	I TL16	T180K,S131K,Q160K	29	95,1
TH15	K147E,Q 175E,K213E	12	TL19	T180K,S131K,Q160K,E123K	32	94,8

30 La expresión de los anticuerpos se midió en conformidad con el Ejemplo de Referencia 1, y la Tm (°C) de cada uno de los anticuerpos preparados se midió en conformidad con el Ejemplo de Referencia 2. El resultado muestra que los valores de Tm para el Fab de G1d/k0, que no tenía introducción de mutaciones, y para el Fab de TH2/TL17, TH13/TL16 y TH15/TL19, en los que se introdujeron mutaciones en CH1/CL, fueron de 95,0 °C, 93,1 °C, 95,1 °C y 94,8 °C, respectivamente. Esto reveló que las mutaciones para regular la interfaz de CH1/CL no tienen un efecto sobre la estabilidad del Fab.

35 [Ejemplo 8] Efecto de la introducción de mutaciones para regular la interfaz de CH1/CL sobre la actividad de unión

La posibilidad de que las modificaciones para regular la interfaz de CH1/CL tengan un efecto sobre la unión al antígeno no se puede descartar por completo. Por lo tanto, para medir la afinidad para IL-6R y GPC3, se midieron las actividades de unión de TH2/TL17, TH13/TL16 y TH15/TL19 en conformidad con el método del Ejemplo de Referencia 5 (Tabla 12).

45 Dado que la actividad de unión a IL-6R y la actividad de unión a GPC3 de TH2/TL17, TH13/TL16 y TH15/TL19, en los que se han introducido mutaciones para regular la interfaz de CH1/CL, no fueron distintas de las actividades de unión de G1d/k0 nativo para IL-6R y GPC3, se hizo evidente que las modificaciones para regular la interfaz de CH1/CL no afectan a las afinidades. Además, cuando las afinidades por los dos antígenos, IL-6R y GPC3, se midieron en conformidad con el Ejemplo de Referencia 5 utilizando los 4ch_004, 4ch_006, 4ch_008 y 4ch_010 preparados en el Ejemplo 4, se descubrió que sus afinidades son iguales a las del G1d/k0 nativo mostradas en la Tabla 12 (Tablas 13 y 14).

50 De acuerdo con los estudios realizados en los Ejemplos 1 a 8, se hizo evidente que solo los componentes que se tenían como objetivo podían purificarse de forma eficaz al introducir una mutación en CH1/CL, sin disminuir la estabilidad del Fab y sin disminuir la actividad de unión.

[Tabla 12]

• Afinidad para GPC3								
cad. H			cad. L			ka	kd	KD (nM)
nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO			
Gld	-	SEQ ID NO: 001	k0	-	SEQ ID NO: 013	2,7E+05	3,6E-04	1,3E-09
TH2	Q175K	SEQ ID NO: 003	TL17	T180E,S131E,Q160E	SEQ ID NO: 030	2,8E+05	3,9E-04	1,4E-09
TH13	K147E,Q175E	SEQ ID NO: 010	TL16	T180K,S131K,Q160K	SEQ ID NO: 029	2,7E+05	4,0E-04	1,5E-09
TH15	K147E,Q175E,K213E	SEQ ID NO: 012	TL19	T180K,S131K,Q160K,E123K	SEQ ID NO: 032	3,9E+05	3,8E-04	9,9E-10
• Afinidad para IL6R								
cad. H			cad. L			Kon	Koff	KD (nM)
nombre	mutación	SEQ ID NO	nombre	mutación	SEQ ID NO			
Gld	-	SEQ ID NO: 001	k0	-	SEQ ID NO: 013	1,5E+05	4,1E-04	2,8E-09
TH2	Q175K	SEQ ID NO: 003	T117	T180E,S131E,Q160E	SEQ ID NO: 030	1,3E+05	5,0E-04	3,8E-09
TH13	K147E,Q175E	SEQ ID NO: 010	TL16	T160K,5131K,0160K	SEQ ID NO: 029	1,6E+05	4,4E-04	2,9E-09
TH15	K147E,Q175E,K213E	SEQ ID NO: 012	TL19	T180K,S131K,Q160K,E123K	SEQ ID NO: 032	2,1E+05	4,8E-04	2,3E-09

[Tabla 13]

NOMBRE	cad. A				cad. B				Afinidad para GPC3				Afinidad para IL6R			
	VH	CH	VL	CL	VH	CH	VL	CL	ka	kd	KD(nM)	ka	kd	KD(nM)		
4ch_001	MH0	G1d	MLO	K0	GpH7	G1d	GpL16	K0	2,7E+05	36E-04	1,3E-09	1,5E+05	4,1E-04	2,8E-09		
4ch_004	MH0	TH2k	MLO	TL17	GpH7	TH13h	GpL16	TL16	2,7E+05	3,8E-04	1,4E-09	1,7E+05	4,7E-04	2,8E-09		
4ch_006	MH0	TH2k	MLO	TL17	GpH7	TH15h	GpL16	TL19	3,4E+05	4,2E-04	1,2E-09	2,0E+05	4,3E-04	2,2E-09		
4ch_001	MH0	G1d	MLO	K0	GpH7	G1d	GpL16	K0	2,7E+05	3,6E-04	1,3E-09	1,5E+05	4,1E-04	2,8E-09		
4ch_008	MH0	TH13k	MLO	TL16	GpH7	TH2h	GpL16	TL17	2,6E+05	3,9E-04	1,5E-09	1,6E+05	4,6E-04	2,8E-09		
4ch_010	MH0	TH 15k	MLO	TL19	GpH7	TH2h	GpL16	TL17	2,9E+05	4,1E-04	1,4E-09	2,4E+05	5,9E-04	2,4E-09		

[Tabla 14]

NOMBRE	cadena	VH			CH			VL			CL		
		nombre	mutación	SEQ ID NO:	nombre	mutación	SEQ ID NO:	nombre	mutación	SEQ ID NO:	nombre	mutación	SEQ ID NO:
4ch_001	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	G1d	K147K	SEQ ID NO: 001	ML0	-	SEQ ID NO: 037	k0	-	SEQ ID NO: 013
4ch_004	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	TH2k	Q175K	SEQ ID NO: 039	ML0	-	SEQ ID NO: 037	TL17	T180E,S131E,Q1 60E	SEQ ID NO: 030
4ch_006	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	TH2k	Q175K	SEQ ID NO: 039	ML0	-	SEQ ID NO: 037	TL17	T180E,S131E,Q1 60E	SEQ ID NO: 030
4ch_001	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	G1d	K147K	SEQ ID	ML0	-	SEQ ID NO: 037	k0	-	SEQ ID NO: 013
4ch_008	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	TH13k	K147E, Q175E	NO: 040	ML0	-	SEQ ID NO: 037	TL16	T180K,S131K,Q1 60K	SEQ ID NO: 029
4ch_010	cad. A	MH0	-	SEQ ID NO: 036	TH15k	K147E, Q175E, K213E	SEQ ID NO: 041	ML0	-	SEQ ID NO: 037	TL19	T180K,S131K, Q160K,E123K	SEQ ID NO: 032
4ch_001	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	G1d	K147K	SEQ ID NO: 001	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	K0	-	SEQ ID NO: 013
4ch_004	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	TH13h	K147E, Q175E	SEQ ID NO: 044	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	TL16	T180K,S131K,Q1 60K	SEQ ID NO: 029
4ch_006	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	TH15h	K147E, Q175E, K213E	SEQ ID NO: 045	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	TL19	T180K,S131K,Q1 60K, E123K	SEQ ID NO: 032
4ch_001	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	G1d	K147K	SEQ ID NO: 001	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	K0	-	SEQ ID NO: 013
4ch_008	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	TH2h	Q175K	SEQ ID NO: 043	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	TL17	T180E,S131E,Q1 60E	SEQ ID NO: 030
4ch_010	cad. B	GpH7	-	SEQ ID NO: 034	TH2h	Q175K	SEQ ID NO: 043	GpL16	-	SEQ ID NO: 035	TL17	T180E,S131E,Q1 60E	SEQ ID NO: 030

[Ejemplo 9]

Las secuencias de aminoácidos de IgA1 humana (SEQ ID NO: 63), IgA2 (SEQ ID NO: 64), IgD (SEQ ID NO: 65), IgE (SEQ ID NO: 66), IgG1 (SEQ ID NO: 67), IgG2 (SEQ ID NO: 68), IgG3 (SEQ ID NO: 69), IgG4 (SEQ ID NO: 70) e IgM (SEQ ID NO: 71) se alinearon con respecto a CH1 de la cadena H; y las secuencias de aminoácidos de IgK (Kappa) humana (SEQ ID NO: 72), IgL1 (SEQ ID NO: 73), IgL2 (SEQ ID NO: 74), IgL3 (SEQ ID NO: 75), IgL6 (SEQ ID NO: 76) e IgL7 (SEQ ID NO: 77) (Lambda) se alinearon con respecto al CL de la cadena L, seguido de sus respectivas comparaciones. Los resultados se muestran en la Fig. 12. Las modificaciones descubiertas en el presente ejemplo se indican con flechas. Como resultado de la introducción de aminoácidos que tienen distintas cargas en la cadena H y la cadena L, de manera que los aminoácidos indicados con las flechas se repelen entre el CH1 de la cadena H y el CL de la cadena L, como se indica en el presente ejemplo, se piensa que la cadena H y la cadena L que se tienen como objetivo pueden asociarse de forma específica.

[Ejemplo de Referencia 1] Preparación de vectores de expresión de anticuerpos, y expresión y purificación de anticuerpos

Las sustituciones de aminoácidos se introdujeron de acuerdo con un método conocido por los expertos en la materia, utilizando el kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene), PCR o el kit In-fusion Advantage PCR Cloning (Takara), etc., seguido de la construcción de los vectores de expresión. Las secuencias de bases de los vectores de expresión obtenidos se determinaron de acuerdo con un método conocido por los expertos en la materia. Los anticuerpos se expresaron transfectando de forma transitoria los plásmidos preparados en líneas de células HEK293H (Invitrogen) obtenidas de células de cáncer de riñón embrionario humano o células FreeStyle 293 (Invitrogen). Los anticuerpos se purificaron a partir del sobrenadante de cultivo obtenido de acuerdo con un método conocido por los expertos en la materia, utilizando rProtein A Sepharose™ Fast Flow (GE Healthcare). La concentración de los anticuerpos purificados se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm utilizando un espectrofotómetro, y la concentración de los anticuerpos se calculó a partir del valor obtenido utilizando un coeficiente de absorción calculado de acuerdo con el método PACE (Protein Science 1995; 4: 2411-2423).

[Ejemplo de Referencia 2] Evaluación de la temperatura de fusión (T_m) de los anticuerpos modificados por calorimetría de barrido diferencial

En este estudio, la estabilidad térmica se evaluó midiendo la temperatura de fusión (T_m) de los anticuerpos, utilizando un calorímetro de barrido diferencial; MicroCal Capillary DSC (DKSH).

Se colocaron alícuotas de 500 µl de cada solución de anticuerpo en una placa de medición y se aumentó la temperatura de 20 °C a 115 °C. Se controlaron la tasa de aumento de temperatura de 120 °C/hora y el cambio en el calor específico.

Los datos se analizaron utilizando Origin7 (Light Stone), y la temperatura a la que se observó un cambio en el calor específico se calculó y definió como el valor de T_m.

[Ejemplo de Referencia 3] Análisis por cromatografía de intercambio aniónico (AIEX)

Los anticuerpos preparados se analizaron mediante el método AIEX, utilizando el Sistema Alliance (Waters). Los análisis se llevaron a cabo de acuerdo con el método de gradiente de dos líquidos usando TSK-gel DEAE-NPR (Tosoh) para la columna analítica, Tris-HCl 10 mmol/l (pH 7,5) para la fase móvil A, y Tris-HCl 10 mmol/l y NaCl 500 mmol/l (pH 7,5) para la fase móvil B. Las mediciones se llevaron a cabo a una longitud de onda de 280 nm.

Los datos se analizaron utilizando Empower2 (Waters), seguido por el cálculo de la relación de cada pico detectado.

[Ejemplo de Referencia 4] Análisis por cromatografía de intercambio catiónico (CIEX)

Los anticuerpos preparados se analizaron mediante el método CIEX, utilizando el Sistema Alliance (Waters). Los análisis se llevaron a cabo de acuerdo con el método de gradiente de dos líquidos usando WCX-10 (Dionex) para la columna analítica, MES 25 mmol/l (pH 6,1) para la fase móvil A, y MES 25 mmol/l y NaCl 500 mmol/l (pH 6,1) para la fase móvil B. Las mediciones se llevaron a cabo a una longitud de onda de 280 nm.

Los datos se analizaron utilizando Empower2 (Waters), seguido por el cálculo de la relación de cada pico detectado.

[Ejemplo de Referencia 5] Medición de la afinidad para IL6R y GPC3

Las interacciones entre un anticuerpo que se tenía como objetivo y hIL6R o GPC3 se analizaron utilizando Biacore T100 (GE Healthcare). Se usó HBS-EP+ (GE Healthcare) para el tampón de corrida y la temperatura de medición fue de 25 °C. La Proteína A/G (Thermo Scientific) se inmovilizó en el Series S Sensor Chip CM5 (GE Healthcare) mediante acoplamiento de aminas, y se usó como chip. Se capturó un anticuerpo que se tenía como objetivo en el chip y se hizo interactuar con cada antígeno diluido con un tampón de corrida. Los anticuerpos capturados en el chip

se lavaron por reacción con glicina-HCl 10 mM (pH 1,5) para regenerar el chip, para usarlo repetidamente.

5 La constante de disociación (KD) de cada anticuerpo para antígeno se calculó llevando a cabo un análisis cinético de los resultados de la medición por Biacore. De manera más específica, la constante de asociación ka (L/mol/s) y la constante de disociación kd (1/s) se calcularon mediante sensogramas de ajuste global obtenidos midiendo con el programa informático Biacore Evaluation en un modelo de unión 1:1 de Langmuir, seguido del cálculo de la constante de disociación KD (mol/l) a partir de esos valores.

10 Aplicabilidad industrial

10 El método proporcionado por la presente invención permite regular la asociación sin alterar la estructura, función, actividad y similares del polipéptido original (anticuerpo), y es extremadamente útil dado que precisa solo un pequeño número de sustituciones de aminoácidos. Además, el método tiene poca influencia sobre la antigenicidad.

15 El uso de la presente invención permite la adquisición eficaz de anticuerpos biespecíficos que, concretamente, retienen la actividad.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
- <120> MOLÉCULAS DE UNIÓN A ANTÍGENOS PARA REGULAR LA INTERACCIÓN ENTRE LA CADENA PESADA Y LA CADENA LIGERA
- 25 <130> C1-A1105P
- <150> JP 2011-238873
- <151> 31-10-2011
- 30 <160> 79
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- 35 <211> 328
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 732 712 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 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

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

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

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

- <210>2
- <211> 328
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> una secuencia sintetizada artificialmente
- <400>2

ES 2 732 712 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 Glu Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

ES 2 732 712 T3

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

ES 2 732 712 T3

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>3

<211> 328

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400>3

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 Lys 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

5

10

ES 2 732 712 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 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

ES 2 732 712 T3

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>5
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

10

<400>5

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 Glu
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Tyr Ser 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>6
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

10

<400>6

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Glu
 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

ES 2 732 712 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 732 712 T3

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

5 <210>7
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente
 <400>7

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

ES 2 732 712 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210>8
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

10

<400>8

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

ES 2 732 712 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
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
 325

<210>9
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400>9

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 Glu Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 732 712 T3

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 10
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

10

<400> 10

ES 2 732 712 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 Glu 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 Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

ES 2 732 712 T3

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> 11

<211> 328

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 11

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 Glu 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 Glu
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

ES 2 732 712 T3

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 325		

<210> 12
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

10

<400> 12

ES 2 732 712 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 Glu 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 Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

ES 2 732 712 T3

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser 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

ES 2 732 712 T3

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

5
<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 13

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

10

15
<210> 14
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> una secuencia sintetizada artificialmente

20 <400> 14

ES 2 732 712 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Glu Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 15
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

10

<400> 15

ES 2 732 712 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Lys Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 16

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Glu Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 17
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

10

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

<210> 18
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 18

ES 2 732 712 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Lys Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

- <210> 20
- <211> 107
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> una secuencia sintetizada artificialmente
- <400> 20

ES 2 732 712 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210>21
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> una secuencia sintetizada artificialmente

10

<400>21

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Lys Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 22
<211> 107

15

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 22

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

10

<210> 23
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

20

<400> 23

ES 2 732 712 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Asp Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 24
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

10

<400> 24

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

35

40

45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val His Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 25

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Lys Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 732 712 T3

<223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 26

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

5

<210> 27

<211> 107

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> una secuencia sintetizada artificialmente

15

<400> 27

ES 2 732 712 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Lys Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Lys Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

- <210> 28
- <211> 107
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> una secuencia sintetizada artificialmente
- <400> 28

ES 2 732 712 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Glu Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 29
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> una secuencia sintetizada artificialmente

10

<400> 29

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Lys Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Lys Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Lys Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

5 <210> 30
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente
 <400> 30

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Glu Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Glu Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

15 <210>31
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

ES 2 732 712 T3

<223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 31

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Lys
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Lys Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Lys Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

5

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> una secuencia sintetizada artificialmente

15 <400> 32

ES 2 732 712 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Glu Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Glu Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 34
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 34

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

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

Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

10

ES 2 732 712 T3

Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Glu Ser Phe
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

5

<210> 35
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 35

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Gln Ala Ser Glu Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

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

10

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu
 100 105 110

15

<210> 36
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 36

ES 2 732 712 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 37
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 37

ES 2 732 712 T3

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

- <210> 38
- <211> 328
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 5
- <220>
- <223> una secuencia sintetizada artificialmente
- 10
- <400> 38

ES 2 732 712 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 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

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

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

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

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

ES 2 732 712 T3

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 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

5 <210> 39
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 39

ES 2 732 712 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 Lys 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

<210> 40
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

10

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 Glu 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 Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 732 712 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 Glu 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 Glu 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 Glu
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

<211> 328
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 42

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

ES 2 732 712 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 43
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

10

<400> 43

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 Lys 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

ES 2 732 712 T3

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

<210> 44
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 732 712 T3

<220>

<223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 44

5

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 Glu 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 Glu Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 732 712 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 325

<210> 45
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

10

<400> 45

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 Glu 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 Glu 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

ES 2 732 712 T3

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

<210> 46
 <211> 119

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 46

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

10 <210> 47
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente
 <400> 47

ES 2 732 712 T3

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

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

Glu Met His Trp Ile Arg Lys Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Glu Ser Phe
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

5 <210> 49
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente
 <400> 49

ES 2 732 712 T3

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

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

Glu Met His Trp Ile Arg Glu Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Glu Ser Phe
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 50
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

10

<400> 50

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

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

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

ES 2 732 712 T3

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210>51

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400>51

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 52

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 52

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Gln Ala Ser Glu Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Glu Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

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

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu
 100 105 110

<210> 53

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 53

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Gln Ala Ser Glu Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Lys Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

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

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

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

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu
 100 105 110

ES 2 732 712 T3

<210> 54
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 54

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
 115 120 125

<210> 55
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 55

15

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> 56
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> una secuencia sintetizada artificialmente

10

<400> 56

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 732 712 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
 325

<210> 57
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 57

ES 2 732 712 T3

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
 100 105

<210> 58
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 58

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

10

<210> 59
<211> 447
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 59

ES 2 732 712 T3

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

<210> 60
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 60
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

ES 2 732 712 T3

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210>61
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 61

5

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

ES 2 732 712 T3

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

Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Glu Ser Phe
 50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

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

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 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> 62
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 62

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Gln Ala Ser Glu Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

10

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

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

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

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
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> 102
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 63

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

Gln Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe
20 25 30

Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly Gln Gly Val
35 40 45

ES 2 732 712 T3

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

Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Leu Ala Gly
 65 70 75 80

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

Val Thr Val Pro Cys Pro
 100

5
 <210> 64
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 64

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

Pro Gln Asp Gly Asn Val Val Val Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe
 20 25 30

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

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

Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Pro Asp Gly
 65 70 75 80

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

10
 Val Thr Val Pro Cys Pro
 100

15
 <210> 65
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 65

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

ES 2 732 712 T3

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

<210> 66
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 66

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

10

<210> 67
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 67

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

5 <210> 68
<211> 98
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 68

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

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

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

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

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

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

Thr Val

ES 2 732 712 T3

<210> 69
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 69

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

10

<210> 70
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 70

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

ES 2 732 712 T3

<210>71
<211> 104
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 71

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

<210> 72
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 72

15

ES 2 732 712 T3

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

<210> 73
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 73

5

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

10

ES 2 732 712 T3

<210> 74
<211> 106
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 74

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

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30

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

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60

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

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

10

<210> 75
<211> 106
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 75

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

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 20 25 30

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

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 50 55 60

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

Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
 100 105

<210> 76
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 76

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

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Lys Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro
 35 40 45

Val Asn Thr Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
 50 55 60

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

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
 85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
 100 105

10

ES 2 732 712 T3

<210> 77
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 77

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

100

105

<210> 78
 <211> 1731
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 78

ES 2 732 712 T3

aactgcagcg ccggggctgg gggaggggag cctactcact cccccaactc ccgggcgggtg 60
actcatcaac gagcaccagc ggcagaggt gagcagtccc ggaaggggc cgagagggcg 120
ggccgccagg tcgggcaggt gtgcgctccg ccccgccgcg cgcacagagc gctagtcctt 180
cggcgagcga gcaccttoga cgcgggtccgg ggaccccctc gtcgctgtcc tcccgcagcg 240
gacccgcgtg cccaggcct cgcgctgccc ggccggctcc tcgtgtcca ctcccggcgc 300
acgccctccc gcgagtcccg gggccctccc gcgcccctct tctcggcgcg cgcgcagcat 360
ggcgcccccg caggtcctcg cgttcgggct tctgcttgcc gggcgacgg cgacttttgc 420
cgcagctcag gaagaatgtg tctgtgaaaa ctacaagctg gccgtaaact gctttgtgaa 480
taataatcgt caatgccagt gtacttcagt tgggtgcacaa aatactgtca tttgctcaaa 540
gctggctgcc aatgtttggt tgatgaaggc agaatgaat ggctcaaac ttgggagaag 600
agcaaacct gaaggggcc tccagaacaa tgatgggctt tatgatcctg actgcatga 660
gagcgggctc ttaagggca agcagtgcaa cggcacctcc atgtgctggt gtgtgaacac 720
tgctggggtc agaagaacag acaaggacac tgaaataacc tgctctgagc gagtgagaac 780
ctactggatc atcattgaac taaaacacaa agcaagagaa aaaccttatg atagtaaaag 840
tttgcgact gcacttcaga aggagatcac aacgcgttat caactggatc caaaatttat 900
cacgagtatt ttgtatgaga ataatgttat cactattgat ctggttcaaa attcttctca 960
aaaaactcag aatgatgtgg acatagctga tgtggcttat tattttgaaa aagatgttaa 1020
aggtgaatcc ttgtttcatt ctaagaaaat ggacctgaca gtaaattggg aacaactgga 1080
tctggatcct ggtcaactt taatttatta tgttgatgaa aaagcacctg aattctcaat 1140
gcaggtcta aaagctggtg ttattgctgt tattgtgggt gtggatag cagttgttgc 1200
tggaattggt gtgctggtta tttccagaaa gaagagaatg gcaaagtatg agaaggctga 1260
gataaaggag atgggtgaga tgcatagga actcaatgca taactatata atttgaagat 1320
tatagaagaa ggaatatagc aatggacac aaattacaaa tgtgtgtgcg tgggacgaag 1380
acatcttga agtcatgag tttgttagtt taacatcata tatttgtaat agtgaaacct 1440
gtactcaaaa tataagcagc ttgaaactgg ctttaccat cttgaaattt gaccacaagt 1500
gtcttatata tgcagatcta atgtaaaatc cagaacttgg actccatcgt taaaattatt 1560
tatgtgtaac attcaaatgt gtgcattaaa tatgcttcca cagtaaaatc tgaaaaactg 1620
atgtgtgatt gaaagctgcc tttctattta cttgagtctt gtacatacat acttttttat 1680
gagctatgaa ataaaacatt ttaaactgaa tttcttaaaa aaaaaaaaaa a 1731

<210> 79
<211> 314
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 79

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
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			

ES 2 732 712 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo IgG biespecífico que comprende dos tipos de regiones constantes de la cadena pesada CH1, CH1-A y CH1-B, y dos tipos de regiones constantes de la cadena ligera CL, CL-A y CL-B, en el que la asociación de la cadena pesada y la cadena ligera está regulada de modo que se inhibe la asociación de CH1-A y CL-B y/o la asociación de CH1-B y CL-A,

en donde

un conjunto o dos o más conjuntos de restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos mostrados en (a) a (c) a continuación en la cadena pesada y la cadena ligera en el anticuerpo biespecífico son restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca:

(a) el resto de aminoácido comprendido en la región constante de la cadena pesada (CH1) en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en la región constante de la cadena ligera (CL) en la posición 180 como se indica mediante la numeración de EU;

(b) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 131 como se indica mediante la numeración de EU; y,

(c) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 175 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 160 como se indica mediante la numeración de EU,

en donde

los restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca se seleccionan de los restos de aminoácidos comprendidos en cualquiera de los conjuntos (X) e (Y) a continuación:

(X) ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D); e

(Y) lisina (K), arginina (R) o histidina (H).

2. El anticuerpo biespecífico de la reivindicación 1,

A) en donde, adicionalmente, los restos de aminoácidos en el conjunto de restos de aminoácidos mostrados en (d) a continuación son restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca:

(d) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 213 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 123 como se indica mediante la numeración de EU; y/o

B) en donde, adicionalmente, dos o más restos de aminoácidos que forman una interfaz entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera son restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca,

en particular

B1) en donde los restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca son un conjunto o dos conjuntos de restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos mostrados en (a) o (b):

(a) el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena pesada en la posición 39 como se indica mediante la numeración de Kabat y el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena ligera en la posición 38 como se indica mediante la numeración de Kabat; o

(b) el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena pesada en la posición 45 como se indica mediante la numeración de Kabat, y el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena ligera en la posición 44 como se indica mediante la numeración de Kabat,

y/o

B2) en donde los restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca se seleccionan de los restos de aminoácidos comprendidos en cualquiera de los conjuntos (X) e (Y) a continuación:

(X) ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D); e

(Y) lisina (K), arginina (R) o histidina (H).

3. Un método de producción de un anticuerpo IgG biespecífico que comprende dos tipos de regiones constantes de la cadena pesada CH1, CH1-A y CH1-B, y dos tipos de regiones constantes de la cadena ligera CL, CL-A y CL-B, en el que la asociación de la cadena pesada y la cadena ligera está regulada de modo que se inhibe la asociación de CH1-A y CL-B y/o la asociación de CH1-B y CL-A,

en donde el método comprende las etapas de (1) a (3) a continuación:

(1) modificación de los ácidos nucleicos que codifican la región constante de la cadena pesada (CH1) y la región

constante de la cadena ligera (CL), de modo que un conjunto o dos o más conjuntos de restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos mostrados en (a) a (c) a continuación se repelen eléctricamente de forma recíproca:

- 5 (a) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 180 como se indica mediante la numeración de EU;
- 10 (b) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 131 como se indica mediante la numeración de EU; y,
- (c) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 175 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 160 como se indica mediante la numeración de EU, en donde

15 los restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca se seleccionan de entre los restos de aminoácidos comprendidos en cualquiera de los conjuntos (X) e (Y) a continuación:

- (X) ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D); e
- 20 (Y) lisina (K), arginina (R) o histidina (H);

(2) introducción de los ácidos nucleicos modificados en una célula hospedadora y el cultivo de la célula hospedadora de modo que exprese los ácidos nucleicos, y

(3) recogida del anticuerpo biespecífico de un cultivo de la célula hospedadora.

25 4. El método de producción de un anticuerpo biespecífico de la reivindicación 3,

A) que comprende adicionalmente en la etapa (1), la modificación de los ácidos nucleicos de modo que los restos de aminoácidos en el conjunto de restos de aminoácidos mostrados en (d) a continuación se repelen eléctricamente entre sí:

30 (d) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 213 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 123 como se indica mediante la numeración de EU; y/o

35 B) que comprende adicionalmente en la etapa (1) la modificación de los ácidos nucleicos de modo que dos o más restos de aminoácidos que forman la interfaz entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera sean restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca,

en particular

40 B1) en donde los restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca son restos de aminoácidos de uno cualquiera de los conjuntos seleccionados del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos mostrados en (a) o (b) a continuación:

45 (a) el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena pesada en la posición 39 como se indica mediante la numeración de Kabat, y el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena ligera en la posición 38 como se indica mediante la numeración de Kabat; o

(b) el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena pesada en la posición 45 como se indica mediante la numeración de Kabat, y el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena ligera en la posición 44 como se indica mediante la numeración de Kabat.

50 y/o

B2) en donde los restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca se seleccionan de restos de aminoácidos comprendidos en cualquiera de los conjuntos (X) e (Y) a continuación:

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

5. Un método para regular la asociación de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo IgG biespecífico que comprende dos tipos de regiones constantes de la cadena pesada CH1, CH1-A y CH1-B, y dos tipos de regiones constantes de la cadena ligera CL, CL-A y CL-B, de modo que se inhibe la asociación de CH1-A y CL-B y/o la asociación de CH1-B y CL-A, en donde el método comprende:

60 la modificación de los ácidos nucleicos de modo que un conjunto o dos o más conjuntos de restos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos mostrados en (a) a (c) a continuación sean restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca:

65 (a) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 180 como se indica mediante la numeración de

EU;

(b) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 147 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 131 como se indica mediante la numeración de EU; y

5 (c) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 175 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 160 como se indica mediante la numeración de EU,

10 en donde los restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca se seleccionan de restos de aminoácidos comprendidos en cualquiera de los conjuntos (X) e (Y) a continuación:

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

15 6. El método de la reivindicación 5,

A) que comprende adicionalmente la modificación de los ácidos nucleicos de modo que los restos de aminoácidos en el conjunto de restos de aminoácidos mostrados en (d) a continuación sean restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca:

20 (d) el resto de aminoácido comprendido en CH1 en la posición 213 como se indica mediante la numeración de EU, y el resto de aminoácido comprendido en CL en la posición 123 como se indica mediante la numeración de EU; y/o

25 B) en donde, adicionalmente, dos o más restos de aminoácidos que forman la interfaz entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera son restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca,

en particular

30 B1) en donde los restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca son restos de aminoácidos de uno cualquiera de los conjuntos seleccionados del grupo que consiste en los conjuntos de restos de aminoácidos mostrados en (a) o (b) a continuación:

35 (a) el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena pesada en la posición 39 como se indica mediante la numeración de Kabat, y el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena ligera en la posición 38 como se indica mediante la numeración de Kabat; o

(b) el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena pesada en la posición 45 como se indica mediante la numeración de Kabat, y el resto de aminoácido comprendido en la región variable de la cadena ligera en la posición 44 como se indica mediante la numeración de Kabat,

40 y/o

B2) en donde los restos de aminoácidos que se repelen eléctricamente de forma recíproca se seleccionan de restos de aminoácidos comprendidos en cualquiera de los conjuntos (X) e (Y) a continuación:

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

7. Una composición que contiene el anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, y un transportador farmacéuticamente aceptable.

50 8. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo biespecífico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2.

9. Una célula hospedadora que tiene el ácido nucleico de la reivindicación 8.

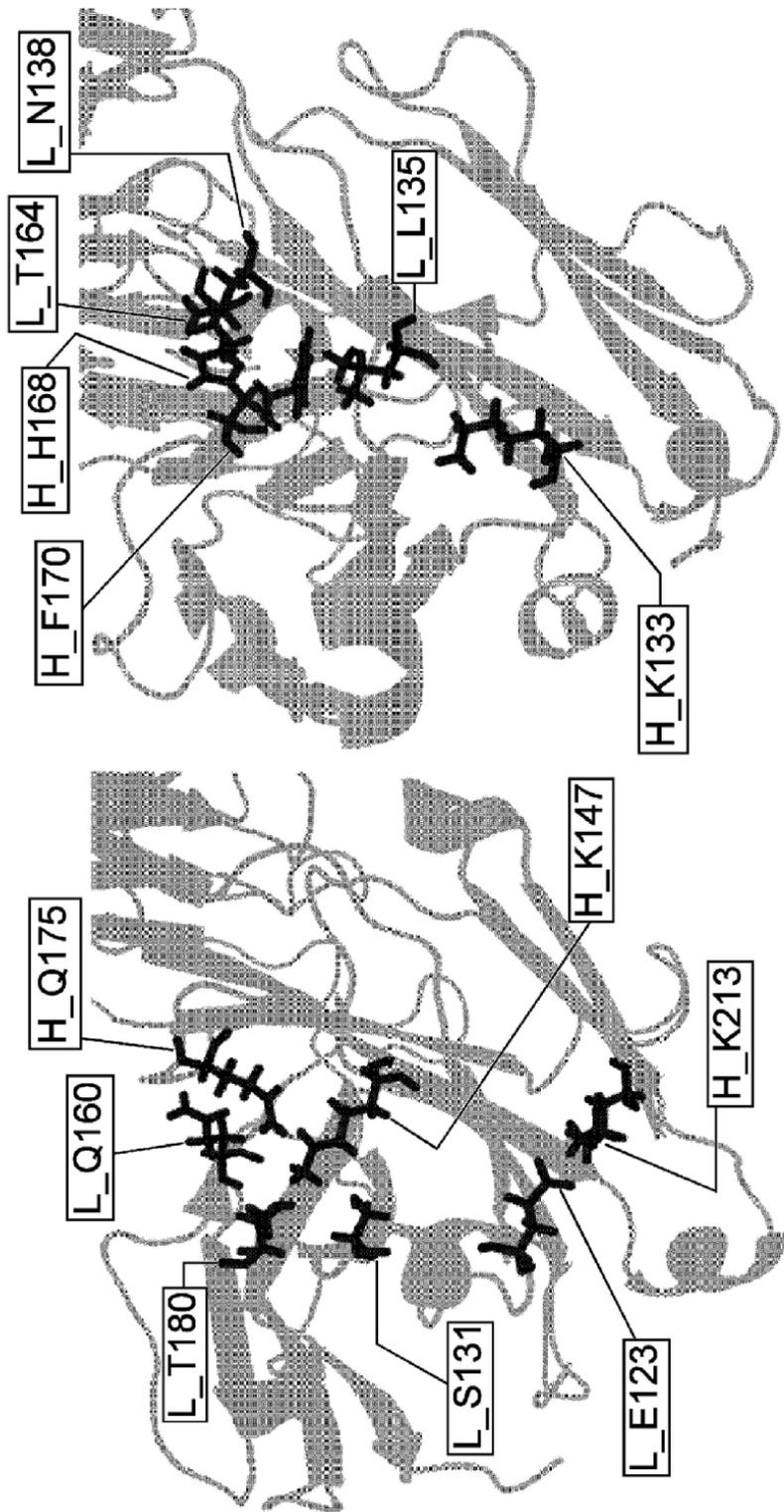


FIG. 1

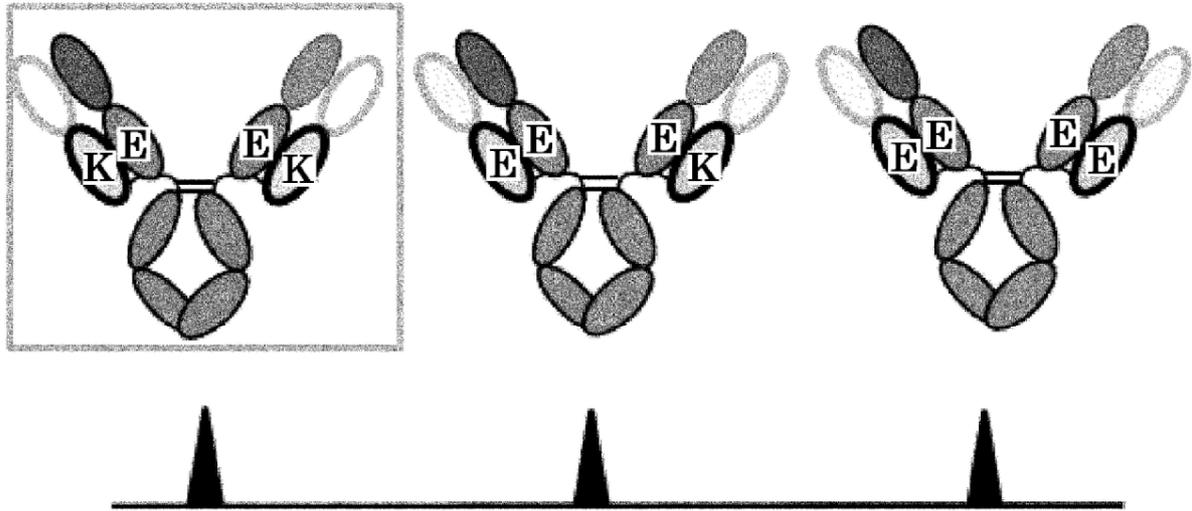


FIG. 2

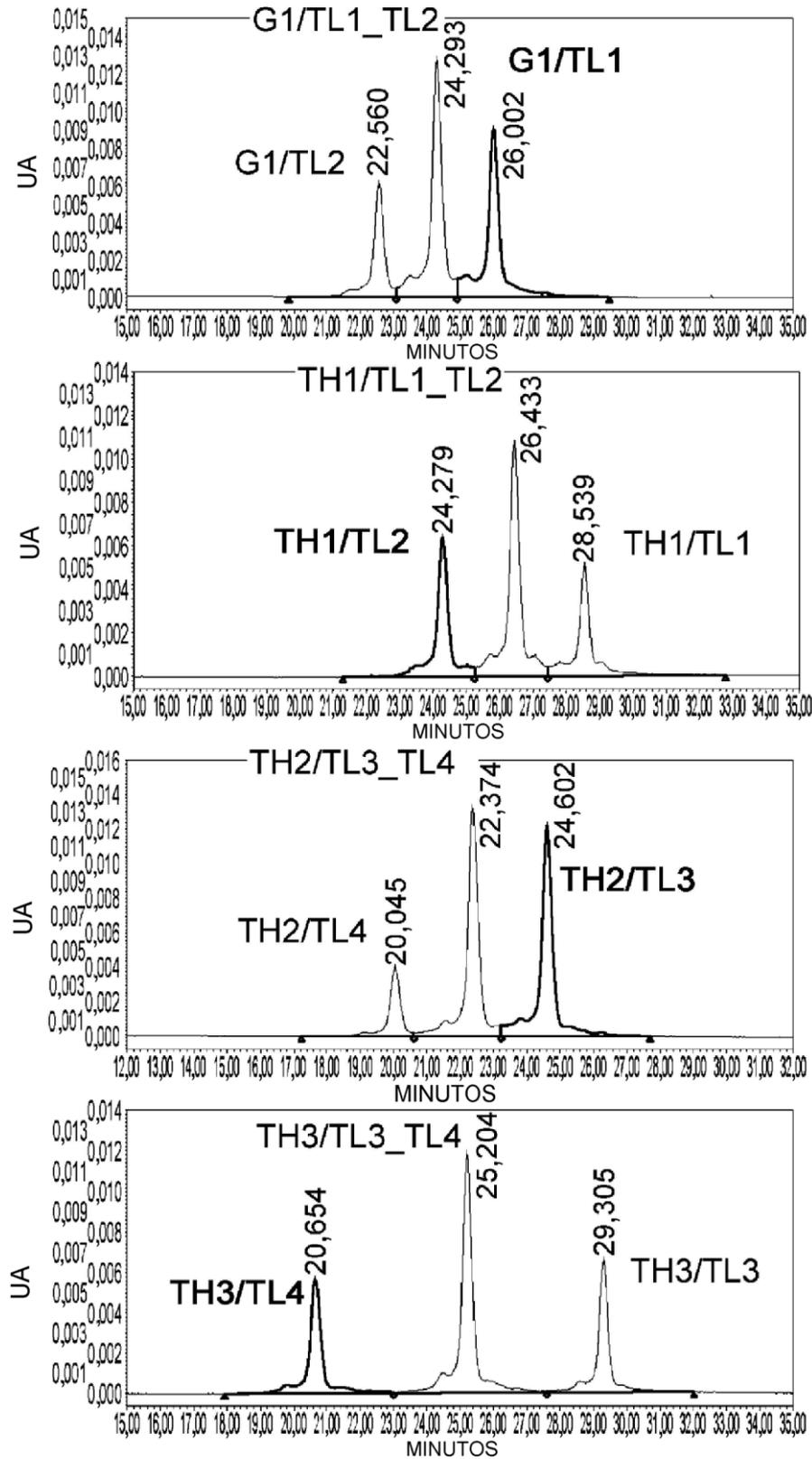


FIG. 3

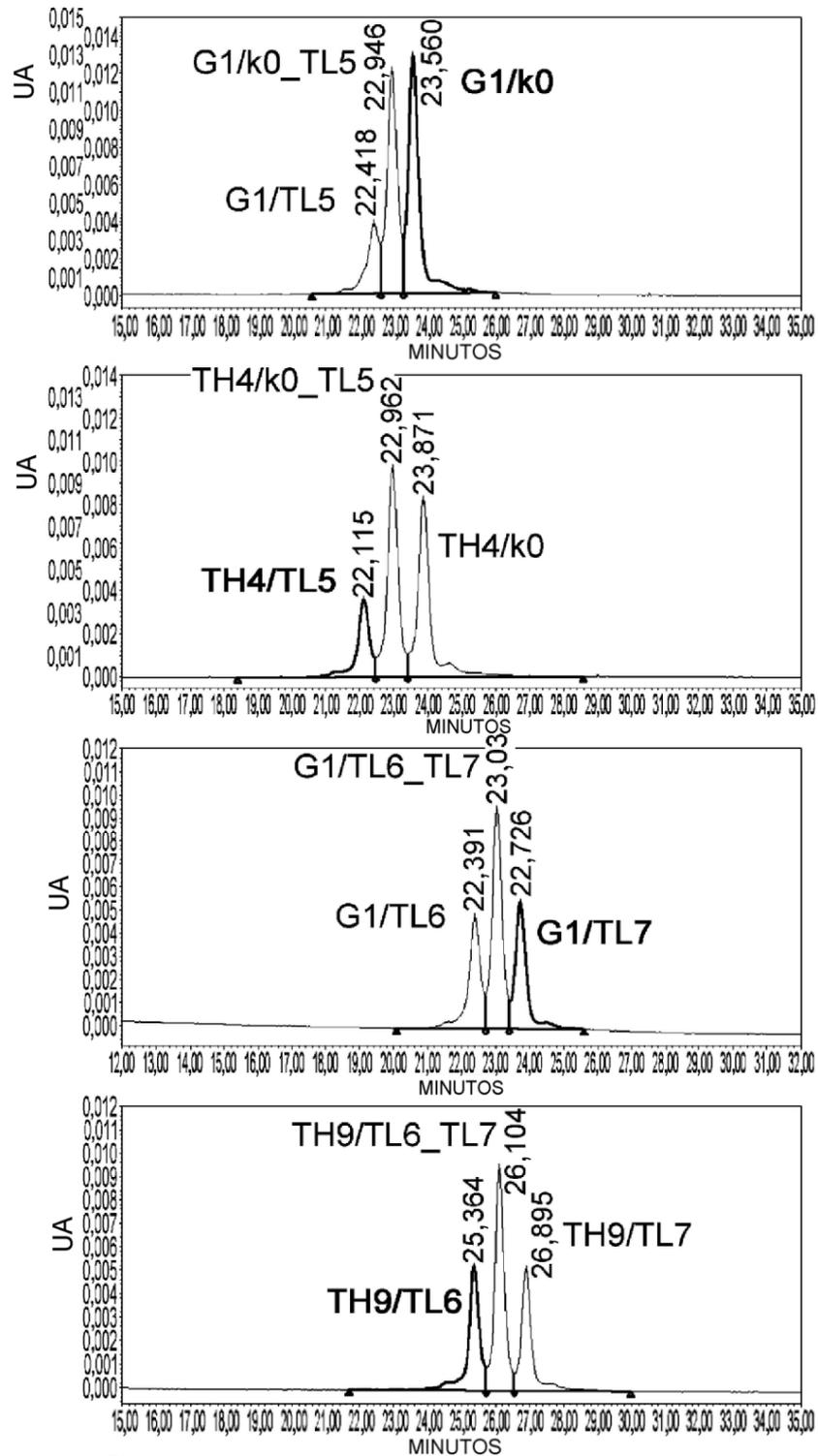


FIG. 4

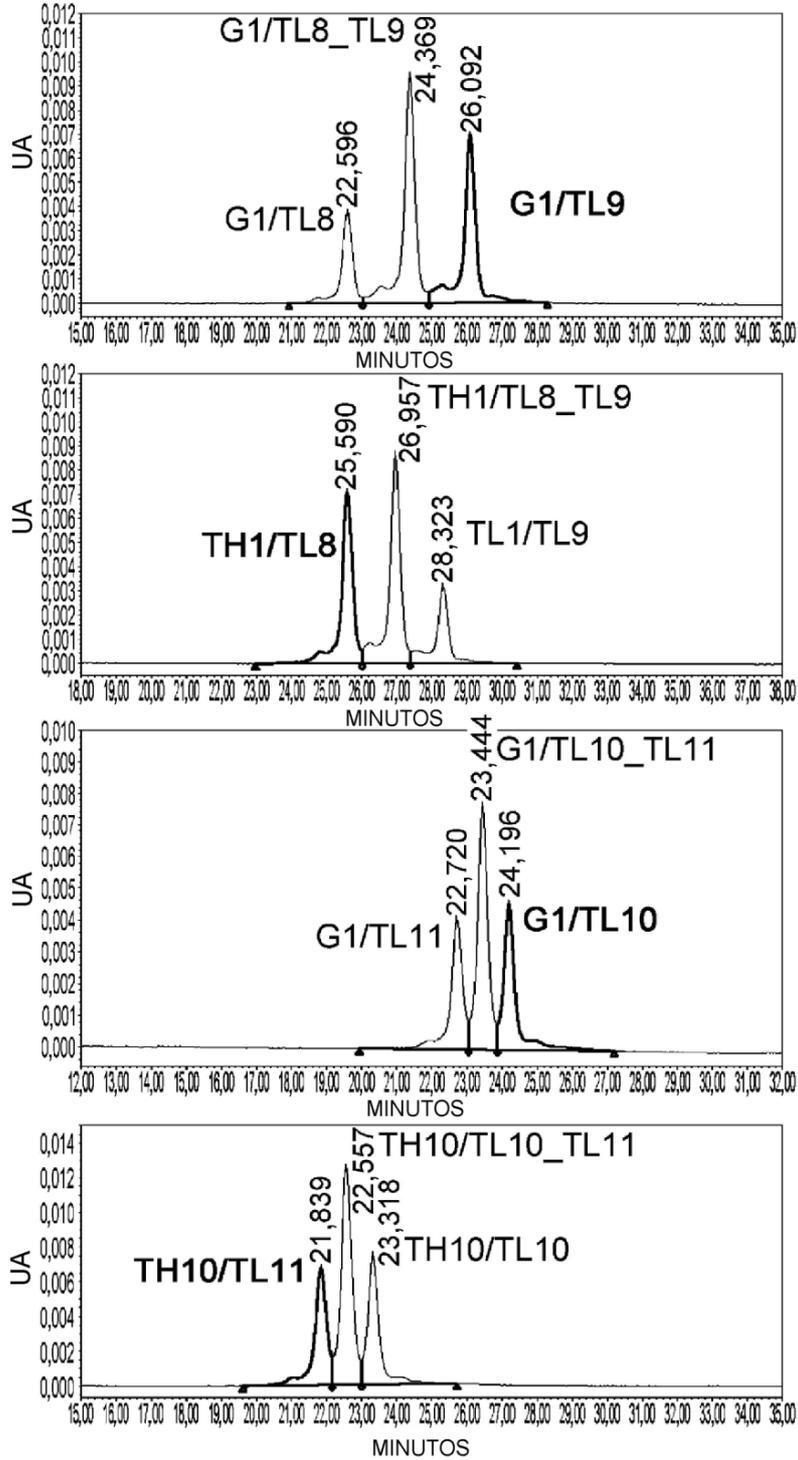


FIG. 5

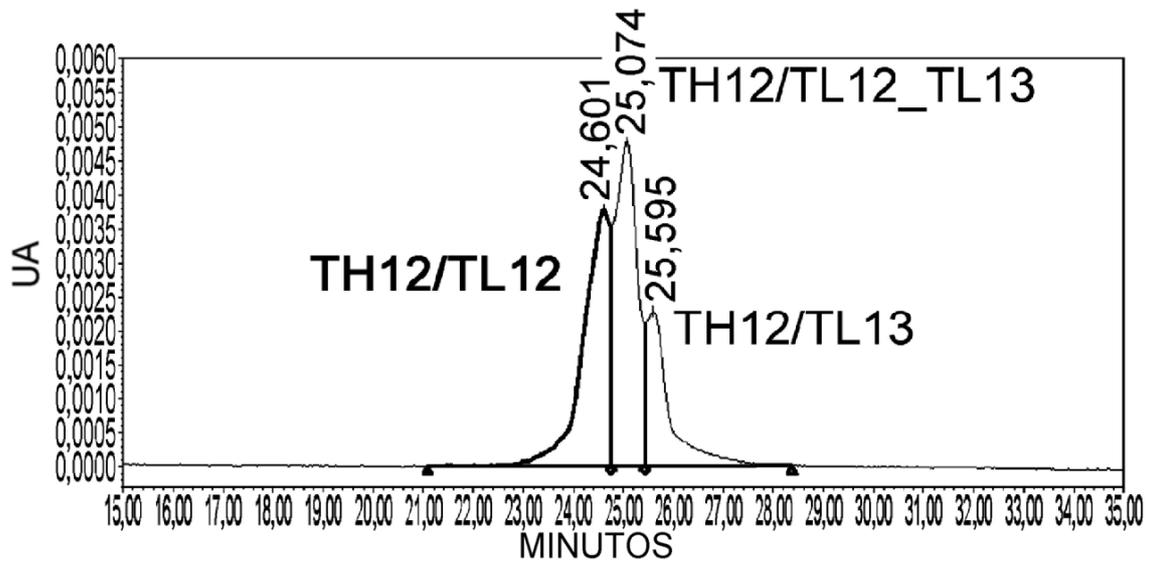


FIG. 6

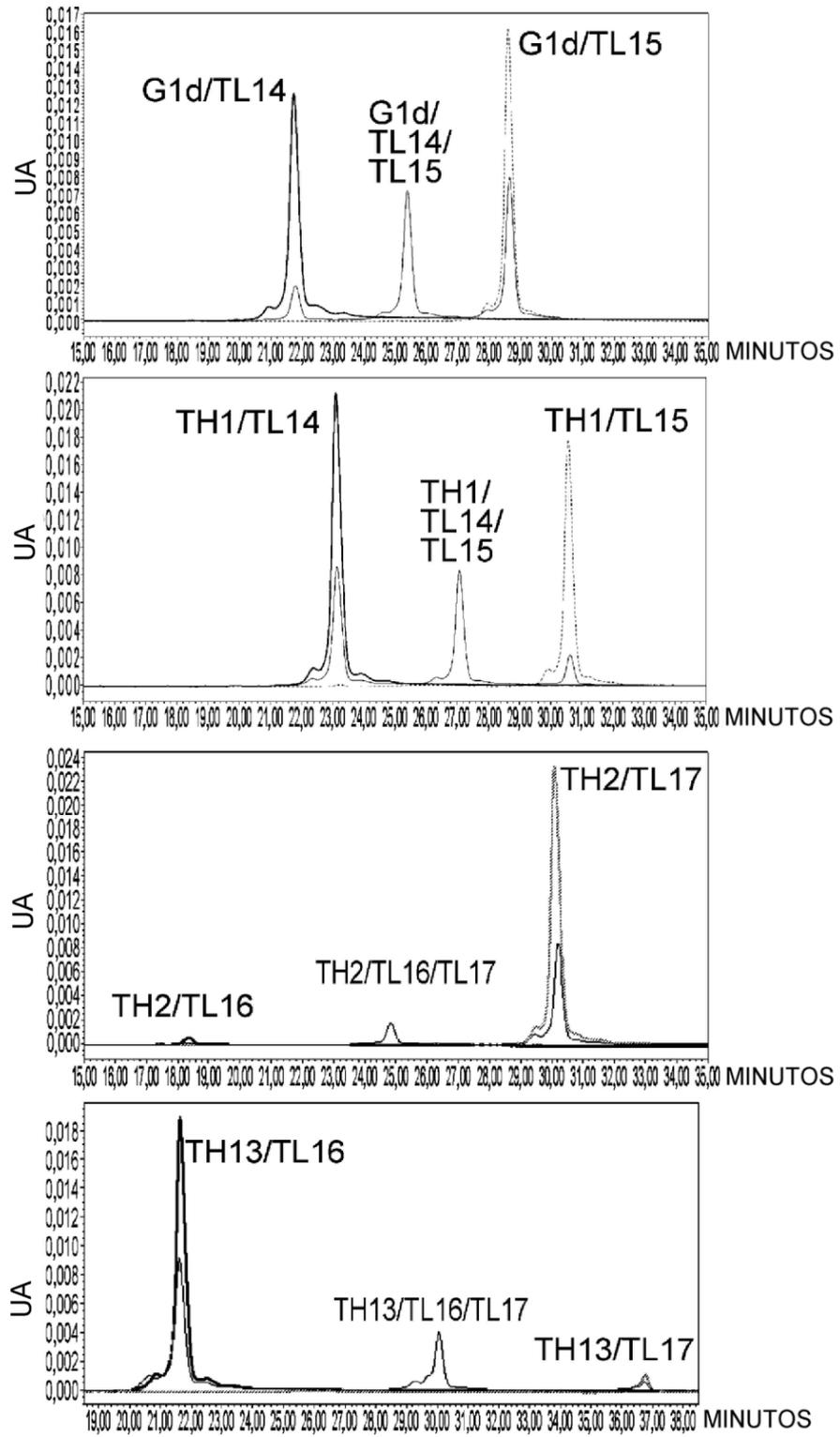


FIG. 7

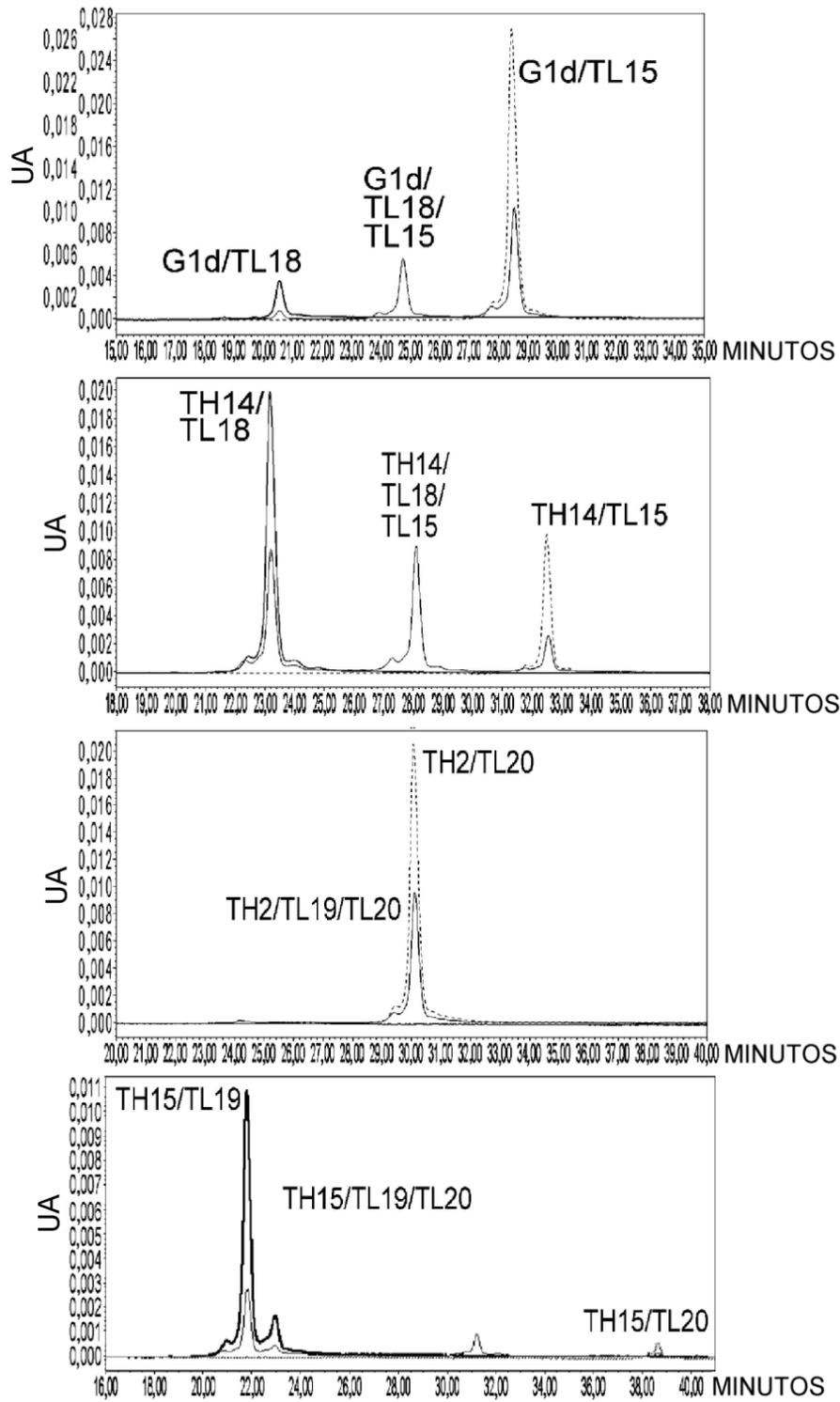


FIG. 8

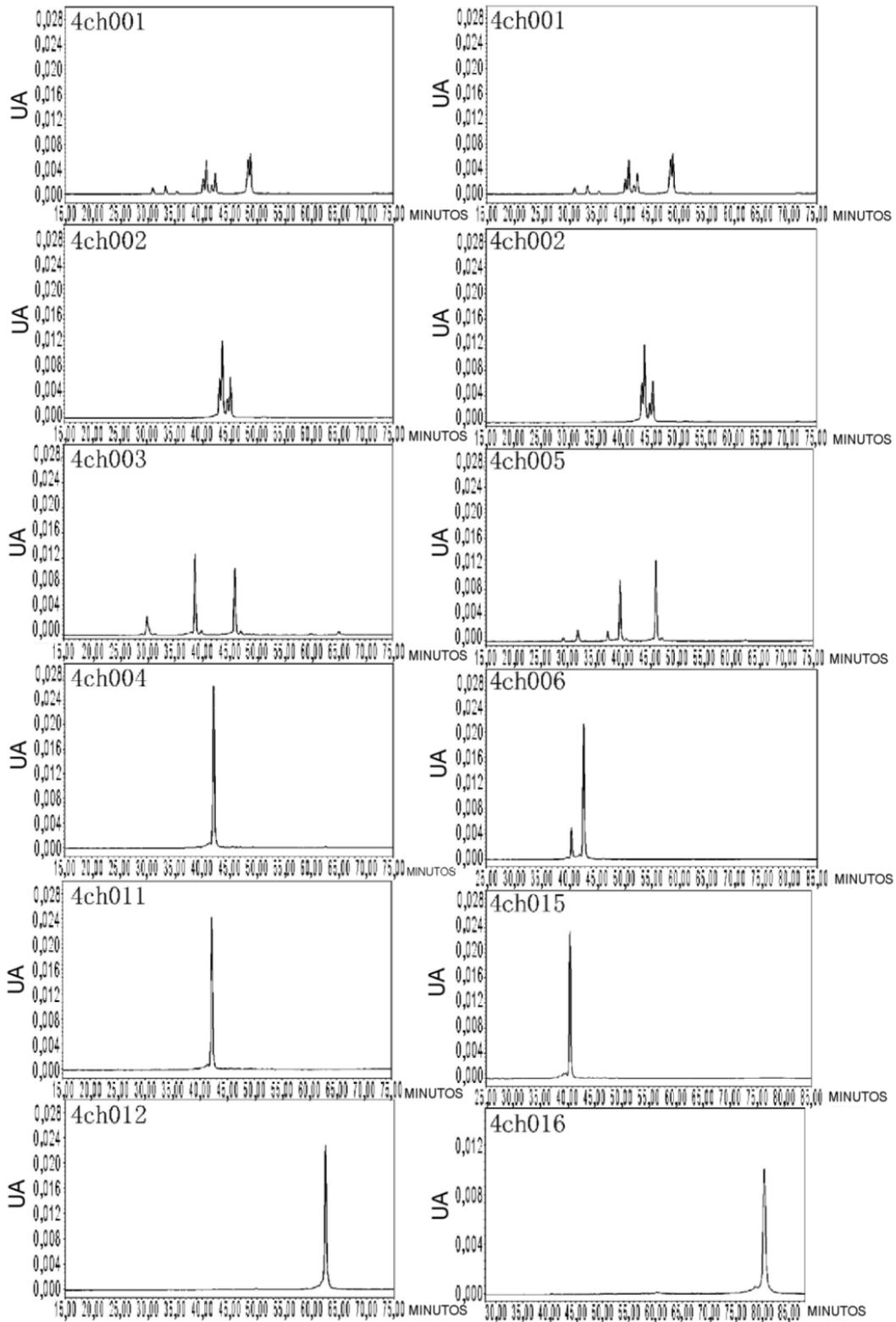


FIG. 9-1

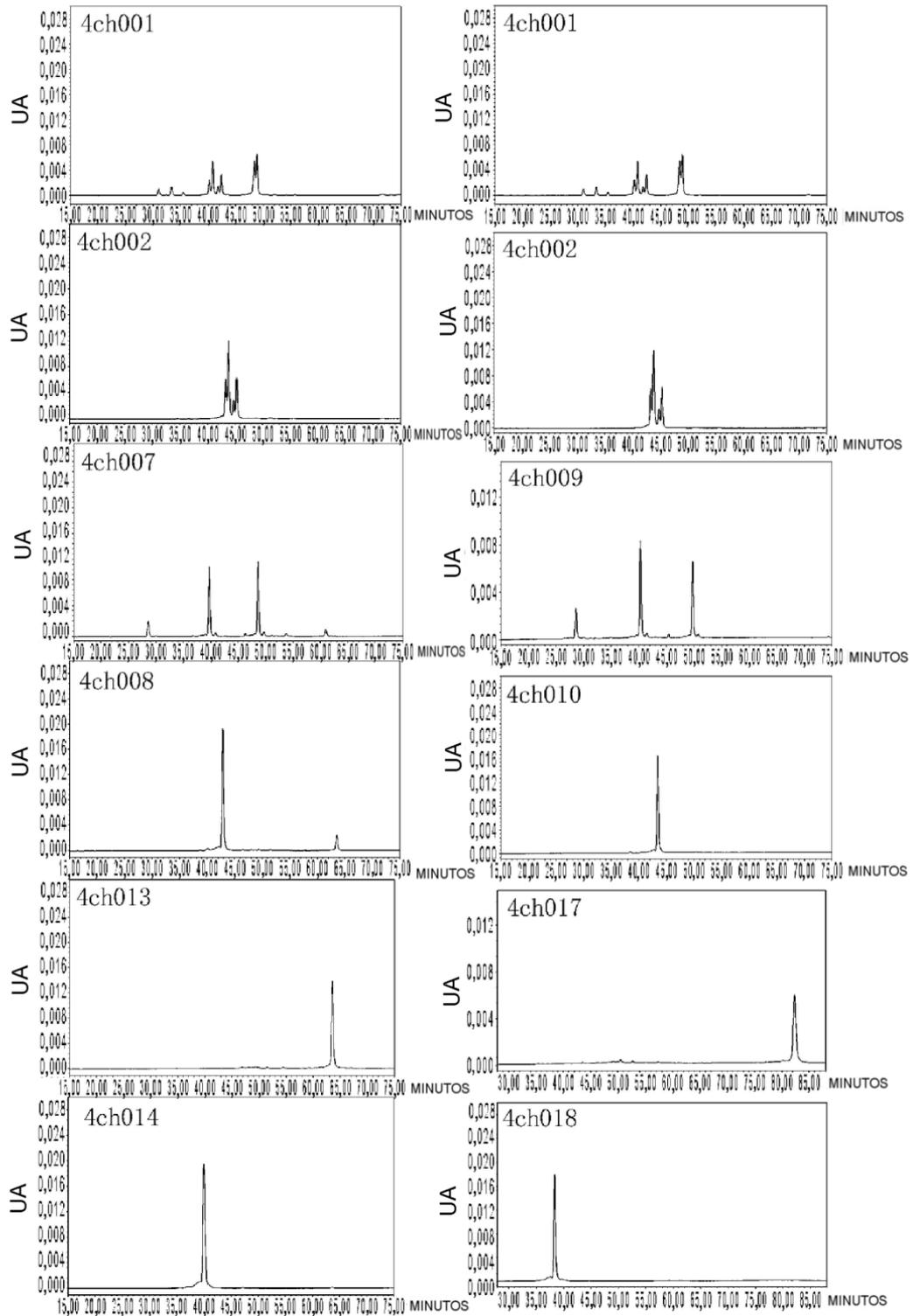


FIG. 9-2

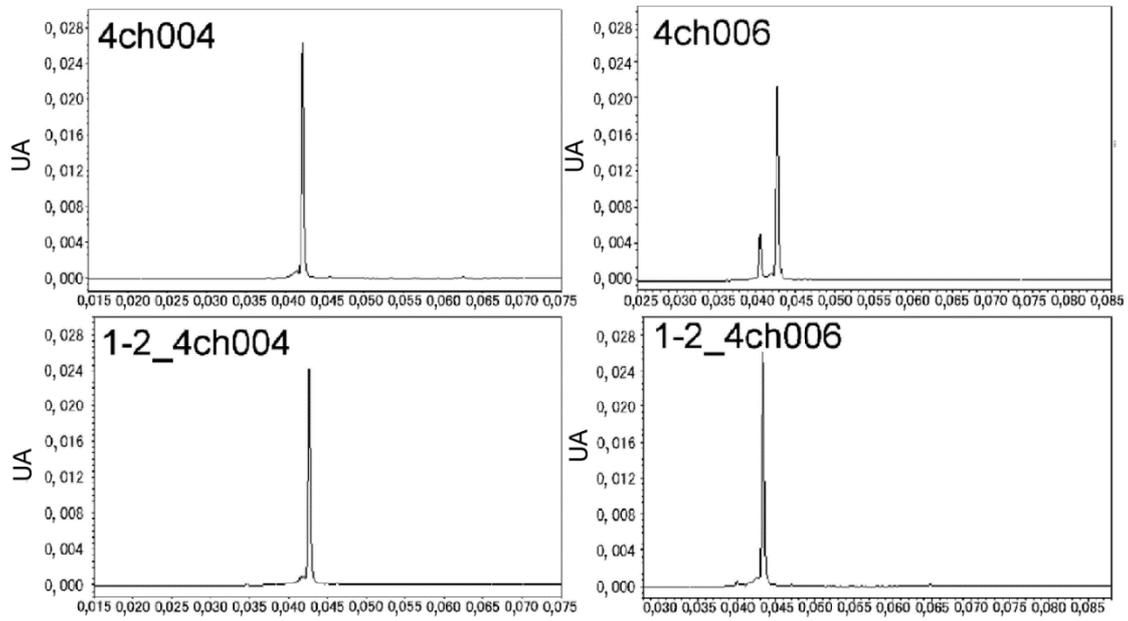


FIG. 10

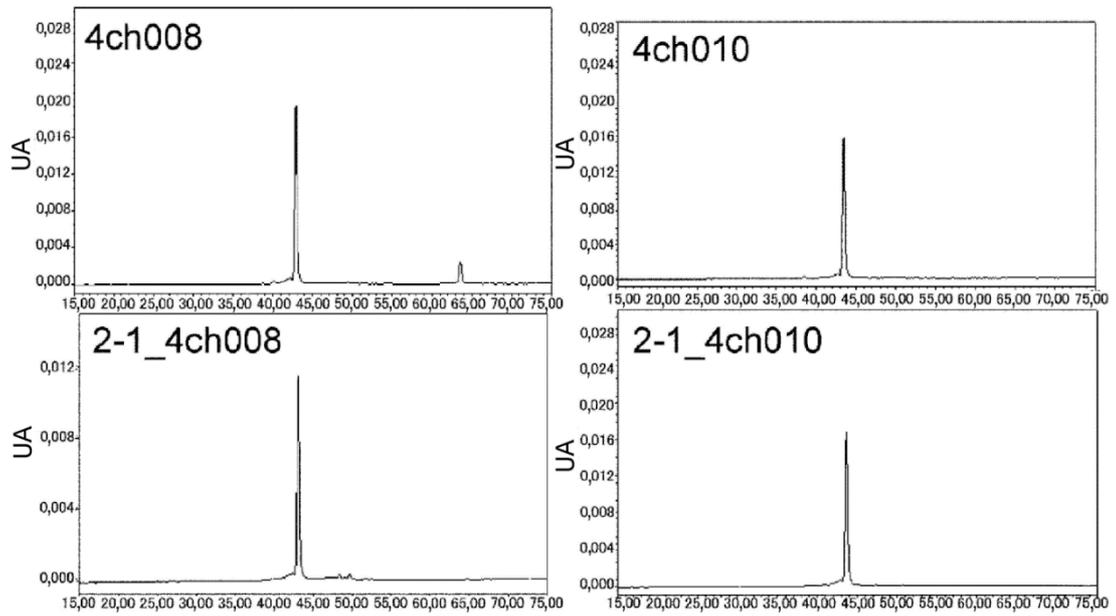


FIG. 11

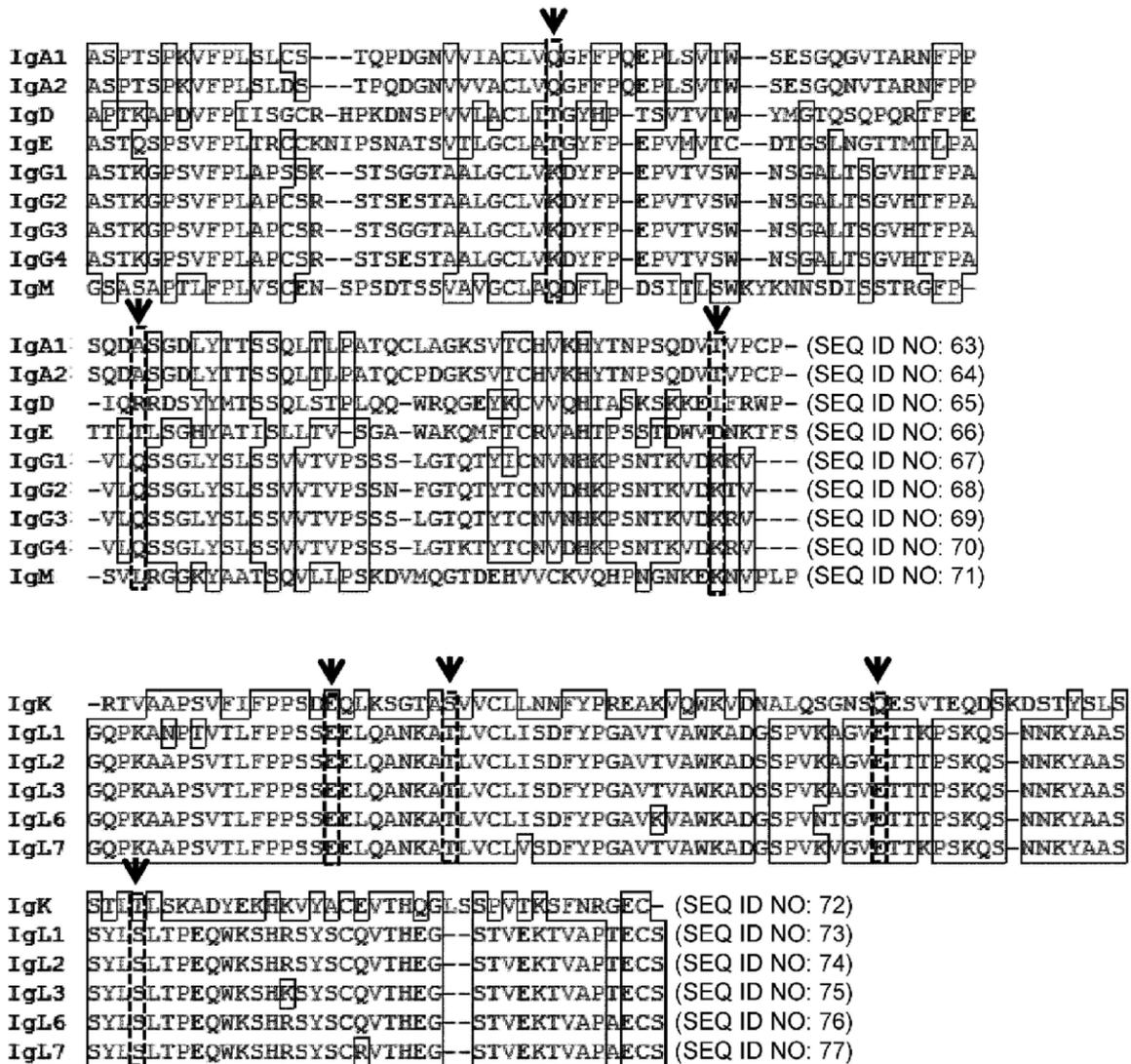


FIG. 12