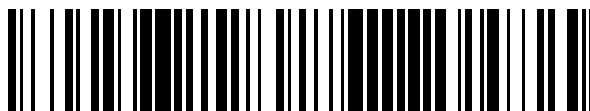


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 107**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2013** **PCT/JP2013/077172**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014** **WO14054804**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2013** **E 13843485 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019** **EP 2905290**

54 Título: **Composición de proteína heterodimérica**

30 Prioridad:

05.10.2012 US 201261710221 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
09.07.2020

73 Titular/es:

KYOWA KIRIN CO., LTD. (100.0%)
1-9-2, Otemachi, Chiyoda-ku
Tokyo, JP

72 Inventor/es:

NIWA, RINPEI;
TSUCHIYA, MAMI;
MURAKAMI, TAKUYA y
TEZUKA, YUTA

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 773 107 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

Composición de proteína heterodimérica.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición de proteína heterodímera que se separa y purifica eficiente y establemente.

10 **Antecedentes de la técnica**

Los anticuerpos monoclonales son polímeros biológicos con elevada afinidad de unión y especificidad para los antígenos, y se aplican como terapéuticos moleculares dirigidos para el tratamiento del cáncer, trastornos inmunitarios o similares. Entre los mecanismos de acción conocidos de la inmunoglobulina G (en adelante abreviado como IgG), que es ampliamente utilizada como anticuerpo monoclonal terapéutico se incluyen la neutralización de antígenos, la acción agonista o antagonista de receptores, la inducción de apoptosis, la fagocitosis, la inducción de citotoxicidad dependiente del complemento o de células efectoras, el transporte de agentes quimioterápicos, toxinas e isótopos radioactivos, o similares.

Los anticuerpos IgG son moléculas tetraméricas compuestas por dos cadenas pesadas de anticuerpo (en adelante abreviado a cadenas H) y dos cadenas ligeras de anticuerpo (en adelante abreviado a cadenas L), que consisten en una región variable, como sitio de unión a antígeno, y una región constante que presenta una secuencia de aminoácidos constante (figura 1).

Cada estructura de anticuerpo es conocido que participa en las diversas funciones. El sitio de unión a antígeno está formado por una región variable de cadena pesada (en adelante abreviado a VH) y una región variable de cadena ligera (en adelante abreviado a VL) y las diversas especificidades de antígeno y afinidades de unión están causadas por variabilidad en la secuencia primaria y en la estructura de orden superior.

Cada región constante de la cadena H de IgG (en adelante abreviado a CH) está compuesta por dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3, y entre ellos, la bisagra, CH2 y CH3 constituyen la región Fc (en adelante, asimismo denominados simplemente Fc). Fc se une al receptor de Fcγ (en adelante abreviado a FcγR) presente sobre los leucocitos que participarán en la liberación de mediadores inflamatorios, fagocitosis y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (en adelante, abreviado a ADCC) y asimismo se une a componentes del complemento que participarán en la citotoxicidad dependiente del complemento (en adelante abreviado a CDC).

Además, Fc del anticuerpo IgG se une al receptor de Fc neonatal (en adelante abreviado a FcRn) en el endosoma bajo condiciones de pH bajo y evita la degradación lisosómica, participando en la extensión de la semivida en sangre. La secuencia primaria de la región Fc varía según sus subclases (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) y su actividad de unión a FcγR, FcRn y componentes del complemento asimismo difiere; por este motivo, causa diferencias en las propiedades biológicas (documento no de patente nº 1).

La molécula de anticuerpo IgG1 presenta dos fragmentos denominados Fab, que están compuestos por VH, CHL, VL y región constante de cadena L (en adelante abreviado a CL), y estos dos Fab forman unión bivalente con moléculas de antígeno. Dicha actividad de unión bivalente incrementa la avidéz para los antígenos, así como induce la señalización intracelular mediante entrecruzamiento de antígenos al unirse los anticuerpos a moléculas de antígeno, tales como receptores presentes sobre la superficie de la membrana celular.

Para evitar la actividad de unión a antígeno bivalente del anticuerpo IgG, se han hecho consideraciones respecto a la ingeniería de anticuerpos, tales como la preparación de anticuerpos monovalentes que presentan un solo sitio de unión a antígeno, o variantes de anticuerpo que presentan una variante de Fc que contiene una sustitución de residuos de aminoácido para eliminar la actividad de unión a FcγR. Además, el fragmento Fab que incluye un sitio de unión a antígeno muestra una actividad de unión monovalente para los antígenos, aunque muestra una semivida en sangre corta y no resulta útil como agente terapéutico debido a que no existe Fc (documento no de patente nº 2).

Además, los anticuerpos biespecíficos pueden presentar mecanismos de acción que no pueden conseguirse mediante los anticuerpos monoclonales IgG convencionales, debido a su biespecificidad. Por ejemplo, el acoplador biespecífico de células T [BiTE (nombre comercial registrado)] se une tanto a CD3 como a un antígeno de cáncer para atraer células T y dañar eficientemente las células de cáncer (documento no de patente nº 3). Además, los anticuerpos biespecíficos presentan la posibilidad de inhibir la señalización intracelular activada, mediante entrecruzamiento del receptor de Fcγ inhibitor, FcγRIIb, con el receptor (documentos no de patente nº 4 y nº 5).

La primera tecnología de producción de anticuerpos biespecíficos es un método de producción que utiliza una célula de fusión de dos hibridomas, denominada cuádrima. En teoría, los tetrámeros compuestos por dos cadenas H diferentes y dos cadenas L diferentes, se producen como una mezcla de hasta 10 ensamblajes, de los cuales solo uno es el anticuerpo deseado con actividad biespecífica. Resulta difícil separar los anticuerpos biespecíficos

deseados de productos secundarios que presentan propiedades físicoquímicas similares (documento no de patente nº 6).

Los métodos conocidos para reducir el tipo de productos secundarios del anticuerpo biespecífico son un método de introducción de una sustitución de residuos de aminoácido que estabiliza un "ensamblaje heterólogo" de las diferentes cadenas H en el dominio CH3 (documentos no de patente nº 7, nº 8 y nº 9, y documento de patente nº 4), y un método de estabilización del ensamblaje heterólogo de cadenas H mediante la utilización de dominios CH3 quiméricos de anticuerpo IgG1 y anticuerpo IgA (documento de patente nº 1).

A este respecto, se ha informado de un método de eliminar productos secundarios no deseables generados mediante "ensamblaje homólogo" de cadenas H homólogas durante la expresión de los anticuerpos biespecíficos en una etapa de purificación y asimismo se conoce un método de purificación que utiliza una diferencia en la afinidad de unión de las subclases de anticuerpo IgG para la proteína A.

Lindhofer et al. han dado a conocer un método de purificación de anticuerpos biespecíficos que consiste en IgG2b de rata y IgG2a de ratón, basado en las propiedades de que IgG2b de rata se une a la proteína A e IgG2a de ratón no se une a la proteína A. Es decir, es conocido que un heterodímero de IgG2b de rata e IgG2a de ratón y un homodímero de IgG2a de ratón se unen a proteína A, y puede aislarse un anticuerpo biespecífico heterodimérico mediante control del pH durante la elución (documento no de patente nº 10).

Además, Samuel et al. han propuesto un método para purificar específicamente anticuerpo biespecífico de tipo IgG humano mediante la utilización de una diferencia en la afinidad para la proteína A. Se ha dado a conocer además que, de las dos cadenas H diferentes que constituyen el anticuerpo biespecífico, el dominio CH3 de una cadena H se somete a modificación de los residuos de aminoácido Arg en la posición 435 y Phe en la posición 436 según el índice EU, reduciendo de esta manera la afinidad de unión para la proteína A y, como resultado, puede separarse el anticuerpo biespecífico de tipo IgG heterodimérica y purificarse a partir de tres moléculas que presentan diferentes afinidades para proteína A mediante control del pH durante la elución (documento de patente nº 2).

Un anticuerpo monovalente heterodimérico que consiste en una cadena H de anticuerpo IgG1 humano y una proteína de fusión de una cadena ligera κ humana y una molécula Fc de IgG1 humana se ha informado como una de las moléculas de anticuerpo preparadas mediante la aplicación de una estructura heterodimérica (documento de patente nº 3).

Sin embargo, es conocido que, al expresarse dicha molécula, no se secretan homodiméricos de cadena H-cadena H, sino que se secretan heterodímeros de proteína de fusión de cadena H, homodímeros de proteína de fusión y multímeros al sobrenadante del cultivo, y resulta necesaria la conjugación de una secuencia de etiqueta con la cadena H para obtener el anticuerpo monovalente heterodimérico específico a partir de las proteínas secretadas, y esta etiqueta debe utilizarse para la purificación. Para la utilización de dicha molécula de anticuerpo monovalente como fármaco, los efectos secundarios causados por posibles multímeros con actividades biológicas inesperadas y una purificación de afinidad complicada y cara que utiliza una secuencia de etiqueta son problemas exigentes.

Técnica relacionada

Documentos de patente:

- [Documento de patente nº 1] WO 2007/110205.
- [Documento de patente nº 2] WO 2010/151792.
- [Documento de patente nº 3] WO 2007/048037.
- [Documento de patente nº 4] WO 2009/089004.
- [Documento de patente nº 5] WO 2011/090754, se refiere a heterodímeros polipeptídicos y usos de los mismos.
- [Documento de patente nº 6] WO 2009/080251, se refiere a anticuerpos biespecíficos bivalentes.
- [Documento de patente nº 7] WO 2012/116927, se refiere a proteína de unión a antígeno monovalente.

Documentos no de patente:

- [Documento no de patente nº 1] Cater et al., Nature Review 6: 343, 2006.
- [Documento no de patente nº 2] Labrijn A F et al, Current Opinion in Immunology 20: 1, 2008.
- [Documento no de patente nº 3] Wolf et al., Drug Discovery Today 10: 1237, 2005.
- [Documento no de patente nº 4] Kufer et al., TRENDS in Biotech. 22: 238, 2004.
- [Documento no de patente nº 5] Jackman et al., J. Biol. Chem. 285: 20850, 2010.
- [Documento no de patente nº 6] Cater et al., J. Immunol. Methods 248: 7, 2001.
- [Documento no de patente nº 7] Ridway et al., Protein Eng. 9: 617, 1996.
- [Documento no de patente nº 8] Merchant et al., Nature Biotech. 16: 677, 1998.
- [Documento no de patente nº 9] Gunasekaran et al., J. Biol. Chem. 285: 19637, 2010.
- [Documento no de patente nº 10] Lindhofer H. et al., J. Immunol. 155: 219, 1995.

Divulgación de la invención**Problemas que debe resolver la invención**

- 5 Con respecto a las proteínas heterodímeras anteriormente conocidas, su eficiencia de producción era baja e inestable, y la producción, separación y purificación específicas de las moléculas de proteína heterodímera resultaban difíciles. De acuerdo con lo anterior, existe una necesidad de una composición de proteína heterodímera que pueda producirse eficiente y establemente, un método de purificación y un método de preparación de la composición de proteína.

Medios para resolver los problemas

La presente invención se refiere a (1) a (24) a continuación.

- 15 [1] Una proteína heterodímera que está compuesta por un primer polipéptido que comprende una región constante (en adelante abreviado a CH) de cadena pesada de inmunoglobulina (en adelante abreviado a cadena H) y un segundo polipéptido que comprende una secuencia de región constante (en adelante denominada CL-Fc) preparada mediante fusión de una región constante (en adelante abreviado a CL) de cadena ligera de inmunoglobulina (en adelante abreviado a cadena L) y una región Fc,

20 y asimismo presenta una eliminación o sustitución de residuos Cys implicados en enlaces disulfuro entre las moléculas de cadena L-cadena H en el anticuerpo IgG, y

25 en la que el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una actividad de unión reducida a un ligante de CH, en el que el ligante de CH es proteína A,

30 en la que el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una eliminación o sustitución de por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado de las posiciones 253, 310, 433, 435 y 436 de la numeración de índice EU tal como en Kabat et al. (en adelante denominado índice EU).

[2] La proteína heterodímera según [1], en la que el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 214 de índice EU por Ser.

35 [3] La proteína heterodímera según cualquiera de [1] a [2], en la que el primer polipéptido es un polipéptido que incluye un dominio CH1, dominio bisagra, dominio CH2 y dominio CH3, y el segundo polipéptido es un polipéptido que incluye dominio CL, dominio bisagra, dominio CH2 y dominio CH3.

40 [4] La proteína heterodímera según cualquiera de [1] a [3], en la que la subclase de inmunoglobulina es cualquier subclase seleccionada de IgG1, IgG2 e IgG4.

[5] La proteína heterodímera según cualquiera de [1] a [4], en la que el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 435 de índice EU por Arg.

45 [6] La proteína heterodímera según cualquiera de [1] a [5], en la que la subclase de inmunoglobulina es IgG4, en la que opcionalmente el primer polipéptido es un polipéptido que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 131 de índice EU por Ser, en la que más opcionalmente, el primer polipéptido y el segundo polipéptido son polipéptidos que presentan por lo menos una sustitución seleccionada de:

- 50 a) una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 228 de índice EU por Pro,
b) una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 409 de índice EU por Lis, o
c) una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 235 de índice EU por Glu.

55 [7] La proteína heterodímera según cualquiera de [1] a [5], en la que la subclase de inmunoglobulina es IgG1, y en la que opcionalmente el primer polipéptido es un polipéptido que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 220 de índice EU por Ser.

60 [8] La proteína heterodímera según [7], en la que el segundo polipéptido es un polipéptido que incluye un dominio bisagra que presenta una eliminación de los residuos de aminoácido en las posiciones 216 a 220 de índice EU o un polipéptido que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 220 de índice EU por Ser y, en la que opcionalmente la cadena de azúcar sin fucosa unida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar entre las cadenas de azúcar totales unidas con N-glucósido de unión a la región Fc incluidas en la proteína heterodímera constituye 20% o más, y/o en la que opcionalmente el primer polipéptido y/o el segundo polipéptido son (es) polipéptidos que presentan una o más sustituciones de residuos de aminoácido seleccionadas de P247I, F243L, R292P, Y300L, Y300F, P396L, T393A, H433P, S239D, S298A, A330L, I332E, E333A, K334A, L235E, P238A, N297A, K322A, P331S, K326A, S267E, H268F, S324T, K274Q, N276K, Y296F, K326W, K326Y, E333A, E333S, A339T, A339D, D356E, L358M, N384S, K392N, T394F, T394Y, V397M y V422I.

65

[9] La proteína heterodímera según cualquiera de [1] a [8], en la que el primer polipéptido y/o el segundo polipéptido son (es) polipéptidos que presentan una o más proteínas de unión unidas al extremo N y/o al extremo C de CH y CL-Fc, en la que opcionalmente la proteína de unión es cualquiera seleccionada de regiones variables de anticuerpo, Fv de cadena sencilla (scFv), dominios variables únicos (VHH), proteínas ligandos y proteínas receptoras.

[10] La proteína heterodímera según cualquiera de [1] a [9], seleccionada de:

- (i) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido es un polipéptido que presenta una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina (en adelante, denominada VH) unida en el extremo N de CH, y el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina (en adelante denominada VL) unida en el extremo N de CL-Fc, y
- (ii) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido es un polipéptido que presenta una VL unida en el extremo N de CH, y el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una VH unida en el extremo N de CL-Fc,
- (iii) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido es un polipéptido que presenta una VH unida en el extremo C de CH, y el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una VL unida en el extremo N de CL-Fc,
- (iv) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido es un polipéptido que presenta una VL unida en el extremo C de CH, y el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una VH unida en el extremo C de CL-Fc.

[11] La proteína heterodímera según cualquiera de [1] a [10], en la que la proteína heterodímera es un anticuerpo seleccionado de un anticuerpo monovalente, un anticuerpo divalente, un anticuerpo trivalente y un anticuerpo tetravalente.

[12] Un ADN codificante de la proteína heterodímera según cualquiera de [1] a [11].

[13] Una célula que expresa una proteína heterodímera, que comprende un vector de expresión de proteína que incluye el ADN de [12].

[14] Un método para preparar una proteína heterodímera, que comprende el procedimiento de cultivar las células que expresan la proteína heterodímera de [13] y purificar la proteína heterodímera a partir del sobrenadante de cultivo.

En la presente memoria se da a conocer, además:

- (1) Una proteína heterodímera que está compuesta por un primer polipéptido que comprende una CH de inmunoglobulina y un segundo polipéptido que comprende CL-Fc, preparada mediante fusión de una CL de inmunoglobulina y una región Fc, y además presenta una eliminación o sustitución de residuos de Cys participantes en enlaces disulfuro entre las moléculas de cadena L-cadena H en el anticuerpo IgG.
- (2) Una proteína heterodímera que está compuesta por un primer polipéptido que comprende una CH de inmunoglobulina y un segundo polipéptido que comprende CL-Fc preparado mediante fusión de una CL de inmunoglobulina y una región Fc, en la que el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una actividad de unión reducida a un ligante de CH.
- (3) La proteína heterodímera indicada en (1) o (2), en la que el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 214 de índice EU de Kabat et al. (en adelante denominado índice EU) por Ser.
- (4) La proteína heterodímera indicada en cualquiera de (1) a (3), en la que el primer polipéptido es un polipéptido que incluye un dominio CH1, dominio bisagra, dominio CH2 y dominio CH3, y el segundo polipéptido es un polipéptido que incluye dominio CL, dominio bisagra, dominio CH2 y dominio CH3.
- (5) La proteína heterodímera indicada en cualquiera de (2) a (4), en la que el ligante de CH es cualquiera seleccionado de un anticuerpo anti-dominio CH1, anticuerpo anti-bisagra, anticuerpo anti-dominio CH2, anticuerpo anti-dominio CH3, proteína receptora de Fc, proteína A y proteína G.
- (6) La proteína heterodímera según cualquiera de (1) a (5), en la que la subclase de inmunoglobulina es cualquier subclase seleccionada de IgG1, IgG2 e IgG4.

- (7) La proteína heterodímera indicada en cualquiera de (1) a (6), en la que el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 435 de índice EU por Arg.
- 5 (8) La proteína heterodímera indicada en cualquiera de (1) a (7), en la que la subclase de inmunoglobulina es IgG4.
- (9) La proteína heterodímera indicada en (8), en la que el primer polipéptido es un polipéptido que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 131 de índice EU por Ser.
- 10 (10) La proteína heterodímera indicada en (9), en la que el primer polipéptido y el segundo polipéptido son polipéptidos que presentan una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 228 de índice EU por Pro.
- 15 (11) La proteína heterodímera indicada en (10), en la que el primer polipéptido y el segundo polipéptido son polipéptidos que presentan una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 409 de índice EU por Lys.
- 20 (12) La proteína heterodímera indicada en (11), en la que el primer polipéptido y el segundo polipéptido son polipéptidos que presentan una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 235 de índice EU por Glu.
- (13) La proteína heterodímera indicada en cualquiera de (1) a (7), en la que la subclase de inmunoglobulina es IgG1.
- 25 (14) La proteína heterodímera indicada en (13), en la que el primer polipéptido es un polipéptido que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 220 de índice EU por Ser.
- (15) La proteína heterodímera indicada en (14), en la que el segundo polipéptido es un polipéptido que incluye un dominio bisagra que presenta una eliminación de los residuos de aminoácido en las posiciones 216 a 220 de índice EU o un polipéptido que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 220 de índice EU por Ser.
- 30 (16) La proteína heterodímera indicada en (15), en la que la cadena de azúcar sin fucosa unida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar de entre el total de cadenas de azúcar unidas a N-glucósido de unión a la región Fc incluidas en la proteína heterodímera constituye 20% o más.
- 35 (17) La proteína heterodímera indicada en (15) o (16), en la que el primer polipéptido y/o el segundo polipéptido son (es) polipéptidos que incluyen por lo menos una sustitución de residuo de aminoácido seleccionada de P247I, F243L, R292P, Y300L, Y300F, P396L, T393A, H433P, S239D, S298A, A330L, I332E, E333A, K334A, L235E, P238A, N297A, K322A, P331S, K326A, S267E, H268F, S324T, K274Q, N276K, Y296F, K326W, K326Y, E333A, E333S, A339T, A339D, D356E, L358M, N384S, K392N, T394F, T394Y, V397M y V422I.
- 40 (18) La proteína heterodímera indicada en cualquiera de (1) a (17), en la que el primer polipéptido y/o el segundo polipéptido son (es) polipéptidos que presentan por lo menos una proteína de unión unida al extremo N y/o al extremo C de CH y CL-Fc.
- 45 (19) La proteína heterodímera indicada en (18), en la que la proteína de unión es cualquiera seleccionada de una región variable de anticuerpo, un Fv de cadena sencilla (scFv), un dominio variable único (VHH), una proteína ligando y una proteína receptora.
- 50 (20) La proteína heterodímera indicada en cualquiera de (1) a (19), seleccionada de: (i) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido es un polipéptido que presenta un VH de inmunoglobulina unido al extremo N de CH y el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta un VL de inmunoglobulina unido al extremo N de CL-Fc, y (ii) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido es un polipéptido que presenta VL unido al extremo N de CH y el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta VH unido al extremo N de CL-Fc.
- 55 (21) La proteína heterodímera indicada en cualquiera de (1) a (20), seleccionada de: (i) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido es un polipéptido que presenta un VH unido al extremo C de CH y el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta un VL de inmunoglobulina unido al extremo C de C-Fc, y (ii) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido es un polipéptido que presenta VL unido al extremo N de CH y el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta VH unido al extremo C de CL-Fc.
- 60
- 65

(22) La proteína heterodímera indicada en cualquiera de (1) a (21), que es cualquiera seleccionada de un anticuerpo monovalente, un anticuerpo divalente, un anticuerpo trivalente y un anticuerpo tetravalente.

(23) Un ADN codificante de la proteína heterodímera indicada en cualquiera de (1) a (22).

(24) Una célula que expresa la proteína heterodímera, que incluye un vector de expresión de proteína que contiene el ADN indicado en (23).

(25) Un método para preparar una proteína heterodímera, que incluye los procedimientos de cultivar las células que expresan la proteína heterodímera indicada en (24) y purificar la proteína heterodímera a partir del sobrenadante de cultivo.

Efectos de la invención

La proteína heterodímera de la presente invención está compuesta por un primer polipéptido que comprende una región constante de cadena pesada (CH) de inmunoglobulina y un segundo polipéptido que comprende CL-Fc preparado mediante fusión de una región constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina y una región Fc, y puede producirse eficiente y establemente mediante la inhibición de la cantidad de multímeros, "halfmeros" y multímeros/halfmeros producidos durante la producción de las proteínas heterodímeras, que resultan de la eliminación o sustitución de residuos Cys que participan en enlaces disulfuro entre las moléculas de cadena L-cadena H en el anticuerpo IgG.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama de un anticuerpo IgG.

La figura 2A es un diagrama que muestra la estructura de la proteína heterodímera de la presente invención.

La figura 2B es un diagrama que muestra las estructuras de anticuerpos monovalentes a tetravalentes típicos que pueden prepararse basándose en la estructura de la proteína de andamiaje heterodímero (HSP) de la presente invención.

La figura 3A representa un anticuerpo monovalente de tipo IgG1. Los residuos de aminoácido subrayados representan una región con introducción de sustitución de residuo de aminoácido (Tabla 1) y los números representan los definidos mediante el índice EU.

La figura 3B representa la secuencia de aminoácidos (IgG1-CH, IgG4-CH) de la región constante de cadena H de anticuerpo monovalente de tipo IgG4. Los residuos de aminoácido subrayados representan una región con introducción de sustitución de residuo de aminoácido (Tabla 1) y los números representan los definidos mediante el índice EU.

La figura 4A representa un anticuerpo monovalente de tipo IgG1. Los residuos de aminoácido subrayados representan una región con introducción de sustitución de residuo de aminoácido (Tabla 2) y los números representan los definidos mediante el índice EU.

La figura 4B representa la secuencia de aminoácidos (IgG1-L, IgG4-L) de CL-Fc de anticuerpo monovalente de tipo IgG4. Los residuos de aminoácido subrayados representan una región con introducción de sustitución de residuo de aminoácido (Tabla 2) y los números representan los definidos mediante el índice EU.

La figura 5 representa las estructuras de diversos anticuerpos monovalentes.

La figura 6 representa la secuencia de aminoácidos del segundo polipéptido de un anticuerpo biespecífico.

La figura 7 representa la estructura de un anticuerpo biespecífico.

Las figuras 8A (a) y (b) representan los resultados del análisis de SDS-PAGE de anticuerpos monovalentes de tipo IgG4 anti-HER2, 4D5/mvG4-1 DF y 4D5/mvG4-2 DF, bajo condiciones no reductoras. En el análisis de SDS-PAGE, se utilizaron las fracciones de elución 1 a 3 eluidas a cada pH en la purificación de proteína A. Las flechas en la figura representan las bandas de multímero.

La figura 8B representa los resultados del análisis de SDS-PAGE de anticuerpos monovalentes de tipo IgG4 anti-HER2, 4D5/mvG4-3 DF y 4D5/mvG4-4 DF, bajo condiciones no reductoras. En el análisis de SDS-PAGE, se utilizaron las proteínas purificadas eluidas colectivamente a pH 3.0 en la purificación con proteína A. Las flechas en la figura representan las bandas de halfmero.

La figura 9 representa los resultados de la cromatografía de intercambio catiónico del anticuerpo monovalente

de tipo IgG4 anti-HER2, 4D5/mvG4-2 DF. Los picos (1) a (10) en la figura representan fracciones fraccionadas.

La figura 10 representa los resultados del análisis de transferencia western de anticuerpo monovalente de tipo IgG4 anti-HER2, 4D5/mvG4-2 DF, con fraccionamiento de muestras (Figura 9) mediante cromatografía de intercambio catiónico. Se utilizó anticuerpo anti-cadena kappa para la detección de cadenas L; se utilizó anticuerpo anti-etiqueta His para la detección de cadenas H y anticuerpo anti-IgG humana para la detección de IgG. Los picos (2), (4), (5), (6), (7) y (10) eran inferiores a los límites de detección.

La figura 11 muestra los resultados de SDS-PAGE, transferencia western específica de cadenas L y transferencia western específica de cadenas H de la fracción X, que es una de las fracciones eluidas a pH 3.5, y de la fracción Y, eluida a pH 5.0 en la purificación con proteína A del anticuerpo monovalente de tipo IgG4 anti-HER2, 4D5/mvG4-2 DF, y 4D5/mvG4-3 DF purificado mediante la utilización de proteína A o proteína G. Tal como se muestra en la Tabla 5, las fracciones X e Y de 4D5/mvG4-2 DF son una fracción de elución que presenta la forma HL como componente principal y una fracción de elución que presenta la forma LL como un componente principal, respectivamente. El producto purificado con proteína G y el producto purificado con proteína A de 4D5/mvG4-3 DF se obtuvieron llevando a cabo una purificación con proteína G o proteína A del sobrenadante de cultivo celular obtenido simultáneamente, eluyéndolos después colectivamente.

La figura 12 representa la cantidad de heterodímero HL de anticuerpo monovalente de tipo IgG4 mediante ELISA de tipo sándwich. El experimento se llevó a cabo con N=3. El eje vertical representa la actividad de unión de heterodímero HL, y el eje horizontal representa la concentración de heterodímero HL ($\mu\text{g/ml}$).

La figura 13A representa la cantidad de heterodímero HL de anticuerpo monovalente de tipo IgG4 en cada fracción de purificación con proteína A mediante ELISA de tipo sándwich. El experimento se llevó a cabo con N=3. El eje vertical representa la actividad de unión de heterodímero HL, y el eje horizontal representa la concentración de heterodímero HL ($\mu\text{g/ml}$).

La figura 13B representa la cantidad de heterodímero HL de anticuerpo monovalente de tipo IgG4 en cada fracción de purificación con proteína A mediante ELISA de tipo sándwich. El experimento se llevó a cabo con N=3. El eje vertical representa la actividad de unión de heterodímero HL, y el eje horizontal representa la concentración de heterodímero HL ($\mu\text{g/ml}$).

La figura 14A representa los resultados de citometría de flujo para evaluar la inhibición de unión competitiva de diversos anticuerpos monovalentes en el ensayo de unión del anticuerpo humanizado anti-HER2 llamado Herceptina, en el que se muestra la actividad de unión para la estirpe celular de cáncer de mama humano positiva para HER2, SK-BR-3. Se calculó la intensidad relativa de fluorescencia en la figura como (intensidad media de fluorescencia de muestra)/(intensidad media de fluorescencia de hIgG1_Alx). El experimento se llevó a cabo con N=2. En todas las figuras, el eje vertical representa la intensidad relativa de fluorescencia (RFI) y el eje horizontal representa las concentraciones (nM) de anticuerpo IgG1 y anticuerpo monovalente que ha reaccionado competitivamente.

La figura 14B representa los resultados de citometría de flujo para evaluar la inhibición de unión competitiva de diversos anticuerpos monovalentes en el ensayo de unión del anticuerpo humanizado anti-CD20 GA101, en el que se muestra la actividad de unión para la estirpe celular Raji de linfoma humano positiva para CD20. Se calculó la intensidad relativa de fluorescencia en la figura como (intensidad media de fluorescencia de muestra)/(intensidad media de fluorescencia de hIgG1_Alx). El experimento se llevó a cabo con N=2. En todas las figuras, el eje vertical representa la intensidad relativa de fluorescencia (RFI) y el eje horizontal representa las concentraciones (nM) de anticuerpo IgG1 y anticuerpo monovalente que ha reaccionado competitivamente.

Las figuras 15A (a) y (b) representan la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) para la estirpe celular de cáncer de mama humano SK-BR-3 por el anticuerpo monovalente de los tipos IgG1 e IgG4 anti-HER2 4D5mvG1-1 DF, en el que se utilizó la fracción 1 (Figura 13), que mostraba el contenido más alto de heterodímero HL, a modo de 4D5/mvG1-1 DF. En el experimento, se utilizaron PBMC obtenidas de otro donante. El experimento se llevó a cabo con N=3. El eje vertical representa la actividad de ADCC y el eje horizontal representa la concentración de anticuerpo (nM).

Las figuras 15B (a) y (b) representan la actividad de ADCC para la estirpe celular de cáncer de mama humano BT-20 por anticuerpo monovalente de tipo IgG4 anti-HER2, de los anticuerpos monovalentes de tipo IgG1 y de tipo IgG4 anti-HER2. En el experimento, se utilizaron PBMC obtenidas de otro donante. El experimento se llevó a cabo con N=3. El eje vertical representa la actividad de ADCC y el eje horizontal representa la concentración de anticuerpo (nM).

Las figuras 16(A) a (c) representan la actividad de ADCC del anticuerpo monovalente de tipo IgG1 anti-CD20 para las estirpes celulares Raji y ST-486 de linfoma de Burkitt y para la estirpe celular MEC-1 de leucemia de células B crónica. El eje vertical representa la actividad de ADCC (%) y el eje horizontal representa la concentración de anticuerpo (nM).

La figura 17 representa los resultados del análisis de SDS-PAGE del anticuerpo monovalente de tipo IgG4 anti-HER2, 4D5/mvG4-4F, anticuerpo monovalente de tipo IgG4 anti-CD74, hLL1/mvG4-4F, anticuerpo biespecífico de HER2-CD74, hLL1-4D5/mvG4-4F y anticuerpo biespecífico de CD74-CD20, hLL1-2F2/mvG4-4F, bajo condiciones no reductoras y reductoras.

Las figuras 18(A) y (b) representan la actividad de unión del anticuerpo biespecífico de HER2-CD74, hLL1-4D5/mvG4-4F, para la proteína HER2 recombinante y la proteína CD74 recombinante mediante ELISA. El eje vertical representa la actividad de unión a antígeno (DO415-490) y el eje horizontal representa la concentración del anticuerpo biespecífico (nM). Se utilizó el anticuerpo anti-HER2 humanizado Herceptina y el anticuerpo anti-CD74 hLL1 como control positivo para el anticuerpo de IgG1 para cada antígeno.

La figura 19 representa la citotoxicidad dependiente del complemento (actividad de CDC) del anticuerpo monovalente anti-CD20 de tipo IgG1, GA101/mvG1-2 y del anticuerpo IgG1 anti-CD20, GA101/IgG1 para la estirpe de linfoma de Burkitt ST-486. El eje vertical representa la actividad de CDC (%) y el eje horizontal representa la concentración molar (nM) de cada anticuerpo monovalente y anticuerpo IgG1.

La figura 20(a) representa las cantidades de unión del anticuerpo monovalente de tipo IgG1 anti-CD20, GA101/mvG1-2, y del anticuerpo IgG1 anti-CD20 GA101/IgG1 a la estirpe celular Raji de linfoma de Burkitt. La figura 20(B) muestra la cantidad de unión del factor del complemento C1q. El eje vertical representa la actividad de CDC (%) y el eje horizontal representa la concentración molar (nM) de cada anticuerpo monovalente y del anticuerpo IgG1.

La figura 21(a) representa las cantidades de unión del anticuerpo monovalente de tipo IgG1 anti-CD20, GA101/mvG1-2, y del anticuerpo IgG1 anti-CD20 GA101/IgG1 a la estirpe celular ST-486 de linfoma de Burkitt. La figura 21(B) muestra la cantidad de unión del factor del complemento C1q. El eje vertical representa la actividad de CDC (%) y el eje horizontal representa la concentración molar (nM) de cada anticuerpo monovalente y del anticuerpo IgG1.

La figura 22A representa la secuencia de aminoácidos del dominio de región constante de cadena H de la proteína heterodímera, incluyendo la región constante de CDC potenciada. Los números de aminoácidos se representan según el índice EU definido por Kabat et al. y ● representa los sitios de sustitución de aminoácido de CDC potenciada del tipo IgG1 y ★ representa los sitios de sustitución de aminoácido para la proteína heterodímera.

La figura 22B representa la secuencia de aminoácidos de la cadena CL-Fc de la proteína heterodímera, incluyendo la región constante de CDC potenciada. Los números de aminoácidos se representan según el índice EU definido por Kabat et al. y ● representa los sitios de sustitución de aminoácido de CDC potenciada del tipo IgG1 y ★ representa los sitios de sustitución de aminoácido para la proteína heterodímera.

La figura 23 representa los resultados de SDS-PAGE utilizando las proteínas purificadas del anticuerpo monovalente de tipo IgG1 anti-CD20 GA101/mvG1-2 y del anticuerpo monovalente anti-CD20 de CDC potenciada GA101/mvCom. DTT representa un estado no reducido y DTT+ representa un estado reducido.

Las figuras 24(a) y (b) representan la actividad de CDC del anticuerpo monovalente de tipo IgG1 anti-CD20 GA101/mvG1-2 y del anticuerpo monovalente anti-CD20 high de CDC potenciada GA101/mvCom para la estirpe celular Raji de linfoma de Burkitt o la estirpe celular MEC-1 de leucemia de células B crónica. El eje vertical representa la actividad de CDC (%) y el eje horizontal representa la concentración molar (nM) de cada anticuerpo monovalente y del anticuerpo IgG1.

Las figuras 25(a) y (b) representan la actividad de ADCC del anticuerpo monovalente de tipo IgG1 anti-CD20 GA101/mvG1-2 y del anticuerpo monovalente anti-CD20 de CDC potenciada GA101/mvCom para la estirpe celular Raji de linfoma de Burkitt o la estirpe celular MEC-1 de leucemia de células B crónica. El eje vertical representa la actividad de ADCC (%) y el eje horizontal representa la concentración molar (nM) de cada anticuerpo monovalente y del anticuerpo IgG1.

Formas de realización para poner en práctica la invención

La presente invención se refiere a una proteína heterodímera según se reivindica que está compuesta por un primer polipéptido que comprende una región constante de cadena pesada (CH) de inmunoglobulina y un segundo polipéptido que comprende CL-Fc preparado mediante fusión de una región constante de cadena ligera (CL) de inmunoglobulina y una región Fc, y además presenta una eliminación o sustitución de residuos Cys que participan en enlaces disulfuro entre las moléculas de cadena L-cadena H en el anticuerpo IgG, un método de purificación de la proteína, un método de preparación de la proteína, un ADN y un vector codificante de la proteína.

1. Estructura de la proteína heterodímera.

La proteína heterodímera de la presente invención es una proteína heterodímera según se reivindica que está compuesta por un primer polipéptido que comprende una CH de inmunoglobulina y un segundo polipéptido que comprende CL-Fc, preparado mediante fusión de una CL de inmunoglobulina y una región Fc de anticuerpo, y además presenta una eliminación o sustitución de residuos de Cys participantes en enlaces disulfuro entre las moléculas de cadena L-cadena H en el anticuerpo IgG típico.

En adelante, a menos que se mencione particularmente lo contrario, la numeración de los aminoácidos se basa en la numeración de índice EU, tal como en Kabat et al. [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept Health and Human Services, 1991] (en adelante denominado únicamente índice EU). Además, el residuo de aminoácido antes de la sustitución se indica antes del número y el residuo de aminoácido después de la sustitución se indica después del número.

En la presente invención, el residuo de Cys que participa en los enlaces disulfuro entre CL y CH típicamente se refiere a residuos Cys que resultan necesarios para formar enlaces disulfuro intermoleculares entre la cadena H y la cadena L del anticuerpo.

Por lo tanto, la proteína heterodímera de la presente invención presenta una eliminación o sustitución de residuos de Cys que están incluidos en CH del primer polipéptido y/o CL-Fc del segundo polipéptido y que asimismo participan en enlaces disulfuro entre las moléculas de cadena L-cadena H en el anticuerpo IgG. La formación de multímeros innecesarios puede reducirse mediante la eliminación o sustitución de los residuos de Cys.

Entre los ejemplos de residuos de Cys en la cadena L que participan en los enlaces disulfuro entre CL y CH1 puede incluirse el residuo de Cys en la posición 214 del índice EU de las cadenas κ y λ humanas.

Además, entre los ejemplos de residuos de Cys en la cadena H que participan en los enlaces disulfuro entre CL y CH1 puede incluirse el residuo de Cys en la posición 220 de la IgG1 humana y el residuo Cys en la posición 131 del anticuerpo IgG4.

Además, asimismo resulta posible la eliminación o sustitución de residuos de aminoácido. Por lo tanto, la sustitución o la eliminación de los residuos de Cys del dominio CH1 o dominio bisagra asimismo resulta posible, junto con la sustitución o la eliminación de los residuos de Cys incluidos en CL.

En la proteína heterodímera de la presente invención, por lo tanto, la CH del primer polipéptido y la CL-Fc del segundo polipéptido están conectados mediante enlaces disulfuro únicamente en el dominio bisagra.

Además, la proteína heterodímera de la presente invención es una proteína según se reivindica compuesta por el primer polipéptido que comprende CH y un segundo polipéptido que comprende CL-Fc preparado mediante fusión de CL y Fc, en la que el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una actividad de unión reducida a un ligante de CH.

En la presente invención, el segundo polipéptido que presenta una actividad de unión reducida o nula al ligante de CH y/o a la proteína de unión a Fc, se refiere al segundo polipéptido según la presente invención que presenta una actividad de unión reducida o nula al ligante de CH y/o al ligante de Fc, por adición, eliminación y/o sustitución de la secuencia de aminoácidos de CL-Fc del segundo polipéptido.

El ligante de CH puede ser cualquiera con la condición de que se una específicamente a la región constante de cadena H de anticuerpo, tal como proteínas, compuestos químicos, resinas o similares, y entre los ejemplos de los mismos pueden incluirse una proteína de unión a Fc, anticuerpo de unión a región constante de cadena H (CH) de anticuerpo o similar.

Entre los ejemplos específicos de la proteína de unión a Fc puede incluirse proteína A derivada de *Staphylococcus aureus*, proteína G hemolítica derivada de *Streptococcus*, receptor de Fc, subclases (Fc γ RI, IIA, IIB, IIIA, IIIB) del mismo, fragmentos de unión de las proteínas anteriormente indicadas, o similares.

El anticuerpo de unión a CH puede ser cualquier anticuerpo con la condición de que se una a por lo menos uno seleccionado de dominio CH1, dominio bisagra, dominio CH2 y dominio CH3, y puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.

El dominio CH1 no está incluido en el segundo polipéptido que constituye el heterodímero de la presente invención y el dominio CH1 está incluido en el primer polipéptido. Por lo tanto, la proteína heterodímera de la presente invención puede purificarse mediante la utilización de anticuerpo anti-CH1 como el ligante de CH.

En la presente invención, el segundo polipéptido que presenta una actividad de unión reducida o nula al ligante de CH se refiere a que la actividad de unión resulta sustancialmente reducida o anulada por una reducción de la

afinidad del ligante de CH. El segundo polipéptido que presenta una actividad de unión reducida o defectuosa es un segundo polipéptido, en el que la actividad de unión al ligante de CH resulta reducida o agotada por la adición, eliminación o sustitución de residuos de aminoácido en el segundo polipéptido que presenta la actividad de unión al ligante de CH, en comparación con el segundo polipéptido original que no presenta adición, eliminación o sustitución de residuos de aminoácido. La actividad de unión del ligante de CH puede examinarse mediante la utilización de un sistema de medición, tal como ELISA de unión, el método de resonancia del plasmón superficial (SPR), o similares, tal como se indica posteriormente.

Por lo tanto, en la proteína heterodímera de la presente invención, el primer polipéptido que comprende CH se une específicamente al ligante de CH anteriormente indicado y el segundo polipéptido que comprende CL-Fc presenta una actividad de unión reducida o nula al ligante de CH y, de esta manera, únicamente la proteína heterodímera compuesta por el primer polipéptido y el segundo polipéptido se une al ligante de CH y puede separarse y purificarse específicamente.

En la presente memoria, en el caso de que la proteína heterodímera de la presente invención se exprese en las células, los homodímeros del primer polipéptido que comprende CH no resultan secretados al exterior de las células. Los monómeros y homodímeros del segundo polipéptido que comprende CL-Fc se secretan al exterior de las células, aunque, debido a que todos presentan una actividad de unión reducida o nula al ligante de CH, mediante purificación basada en la actividad de unión específica al ligante de CH puede separarse y purificarse específicamente la proteína heterodímera compuesta por el primer polipéptido y el segundo polipéptido.

Como método para expresar, separar y purificar específicamente la proteína heterodímera de la presente invención sin utilización de un ligante de CH, puede utilizarse una proteína de fusión preparada mediante fusión de una etiqueta apropiada con el extremo N o C-terminal del primer polipéptido de la presente invención.

Entre los ejemplos específicos de la etiqueta pueden incluirse una etiqueta de histidinas (en adelante abreviado a "etiqueta His"), una etiqueta myc, una etiqueta FLAG, una etiqueta hemaglutinina (HA), una etiqueta glutatión-S-transferasa (GST) o similar. El método anteriormente descrito puede aplicarse en combinación con la separación y purificación de la proteína heterodímera de la presente invención.

En la presente invención, el segundo polipéptido que presenta una actividad de unión reducida o nula al ligante de CH se prepara llevando a cabo la adición, eliminación y sustitución de secuencias de aminoácidos de CL-Fc incluidas en el segundo polipéptido.

La CL-Fc con actividad de unión reducida o nula a proteína A incluye CL-Fc que presenta una eliminación o sustitución de por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado de las posiciones 253, 310, 433, 435 y 436 del índice EU, preferentemente CL-Fc que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 435 del índice EU, y CL-Fc que presenta una sustitución de los residuos de aminoácido en las posiciones 435 y 436 del índice EU, y más preferentemente, CL-Fc que presenta una sustitución de His en la posición 435 por Arg y una sustitución de Tyr en la posición 436 por Phe, y CL-Fc que presenta una sustitución de His en la posición 435 por Arg.

Con respecto a otras proteínas de unión a CH, la actividad de unión de la proteína de unión a CH puede reducirse llevando a cabo la adición, eliminación y sustitución de la secuencia de aminoácidos de unión de CH a la proteína de unión. Por ejemplo, el segundo polipéptido que presenta una actividad de unión reducida a cada proteína o anticuerpo de unión a CH puede prepararse llevando a cabo la sustitución y/o eliminación de por lo menos un residuo de aminoácido incluido en el epítipo que está presente en CH de la proteína heterodímera de la presente invención, tal como el sitio de unión en Fc que se une a proteína G, un epítipo que se une a anticuerpo anti-Fc y un epítipo que se une a anticuerpo anti-dominio bisagra.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. En el caso de que el epítipo se especifique claramente para cada anticuerpo, pueden sustituirse los residuos de aminoácido incluidos en el epítipo de cualquier anticuerpo.

Además, la proteína heterodímera de la presente invención es una proteína según se reivindica que está compuesta por un primer polipéptido que comprende CH y un segundo polipéptido que comprende CL-Fc preparado mediante fusión de CL y Fc, en el que el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una actividad de unión reducida al ligante de CH y asimismo presenta una eliminación o sustitución de residuos Cys que participan en enlaces disulfuro entre las moléculas de cadena L-cadena H en el anticuerpo IgG.

La proteína heterodímera de la presente invención es una proteína según se reivindica compuesta por un primer polipéptido que comprende CH y un segundo polipéptido que comprende CL-Fc preparado mediante fusión de CL y Fc, en la que el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una actividad de unión reducida a un ligante de CH y CH y CL-Fc están conectados mediante enlaces disulfuro únicamente en el dominio bisagra.

Específicamente, la proteína heterodímera de la presente invención es una proteína según se reivindica que está

compuesta por un primer polipéptido que comprende CH y un segundo polipéptido que comprende CL-Fc, en el que el segundo polipéptido es cualquier polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: (i) un polipéptido que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 214 por otro residuo de aminoácido, (ii) un polipéptido que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 220 por otro residuo de aminoácido, (iii) un polipéptido que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 214 por Ser, (iv) un polipéptido que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 220 por Ser, (v) un polipéptido que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 435 por Arg, (vi) un polipéptido que presenta sustituciones de los residuos de aminoácido en las posiciones 214 y 435 por Ser y Arg, (vii) un polipéptido que presenta sustituciones de los residuos de aminoácido en las posiciones 220 y 435 por Ser y Arg, y (viii) un polipéptido que presenta sustituciones de los residuos de aminoácido en las posiciones 214, 435 y 436 por Ser, Arg y Phe, numerados según el índice EU.

Además, la proteína heterodímera de la presente invención es una proteína según se reivindica compuesta por el primer polipéptido y el segundo polipéptido que presentan un dominio de unión unido a por lo menos uno seleccionado de extremo N y extremo C de CH y CL-Fc, en la que el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una actividad de unión reducida a un ligante de CH.

En la presente invención, el dominio de unión puede ser cualquier proteína con la condición de que sea una proteína con una actividad de unión a otra molécula, y específicamente, puede incluir un fragmento de anticuerpo, una región variable de anticuerpo (en adelante, abreviado a 'V'), Fv de cadena sencilla (scFv), Fab, Fab', F(ab')₂, diacuerpo, Fv estabilizado por disulfuro (dsFv) y un péptido que comprende CDR, un dominio variable único (VHH), una proteína ligando, una proteína receptor o similar.

El CH incluido en el primer polipéptido de la proteína heterodímera de la presente invención está compuesto por dominio CH1, dominio bisagra, dominio CH2 y dominio CH3, que constituyen una región constante de anticuerpo. Se encuentra disponible cualquier isotipo, aunque el isotipo IgG resulta preferente.

La subclase de IgG puede ser cualquier subclase de IgG1, IgG2 e IgG4. Además, el primer polipéptido puede incluir un dominio bisagra de cada isotipo/subclase de inmunoglobulina, o un dominio bisagra que presenta una adición, eliminación o sustitución de una parte de su secuencia de aminoácidos. Un dominio bisagra de isotipo/subclase idéntica a Fc y un dominio bisagra que presenta una sustitución de residuo de aminoácido puede resultar preferente. Además, el dominio bisagra puede extenderse o acortarse para que resulte adecuado para la producción de la proteína heterodímera de la presente invención.

En la presente invención, el CH comprendido en el primer polipéptido puede ser un CH que presentar cualquier secuencia de aminoácidos con la condición de que resulte adecuado para la producción eficiente y estable de la proteína heterodímera, y preferentemente, un CH que incluye la adición, eliminación y sustitución de una secuencia de aminoácidos.

Específicamente, puede incluir CH que incluya por lo menos una sustitución de residuo de aminoácido seleccionada de sustituciones del residuo de aminoácido en la posición 131 por S, el residuo de aminoácido en la posición 133 por K, el residuo de aminoácido en la posición 220 por S, el residuo de aminoácido en la posición 228 por P y el residuo de aminoácido en la posición 409 por K, numerados según el índice EU.

El número de residuos de aminoácido que deben sustituirse es de 1 a 15, preferentemente de 1 a 10, más preferentemente de 1 a varios, y todavía más preferentemente de 1 a 5 residuos de aminoácido. En el caso de la subclase IgG1, puede proporcionarse como ejemplo CH que incluye una sustitución de C220S del dominio bisagra.

El residuo de aminoácido en la posición 220 según índice EU es conocido que participa en el enlace disulfuro con la cadena L en IgG1, y la sustitución o eliminación de este residuo de aminoácido puede causar un defecto en el enlace disulfuro de CL-dominio bisagra.

En el caso de la subclase IgG4, puede proporcionarse como ejemplo CH que incluye por lo menos una sustitución de residuo de aminoácido seleccionada de C131S y R133K del dominio CH1, S228P del dominio bisagra, y R409K, R409T, R409M y R409L del dominio CH3, preferentemente CH que incluye las sustituciones de residuo de aminoácido C131S y R409K, más preferentemente CH que incluye las sustituciones de residuos de aminoácido C131S, R133K y R409K, y CH que incluye las sustituciones de residuos de aminoácido C131S, R133K, S228P y R409K.

El residuo de aminoácido en la posición 409 según el índice EU es conocido que participa en la interacción estable entre los dominios CH3-CH3 de la región Fc de anticuerpo, y de esta manera, puede obtenerse el efecto de mejorar la estabilidad de la interacción Fc-Fc y los efectos de inhibir el intercambio de brazo Fab y la agregación a pH bajo mediante las modificaciones de aminoácidos R409K, R409T, R409M y R409L.

Además, con el fin de incrementar la capacidad de formación de heterodímeros CH3/CH3 incluidos en la proteína heterodímera, las modificaciones de residuo de aminoácido K409D/K392D y D399K/E356K (documento n° WO

2009/089004) o tecnología SEED con subclases de inmunoglobulina (documento nº WO 2007/110205) asimismo pueden combinarse en el heterodímero de la presente invención.

El residuo Ser en la posición 228 según el índice EU es conocido que participa en la inestabilidad de los enlaces disulfuro entre dominios bisagra, y la modificación de aminoácidos S228P participa en la estabilización del dominio bisagra.

CL incluido en el segundo polipéptido de la proteína heterodímera de la presente invención puede ser cualquiera según la presente invención de cadena κ y cadena λ . Además, Fc incluido en el segundo polipéptido está compuesto por dominio bisagra, dominio CH2 y dominio CH3. Se encuentra disponible cualquier isotipo, aunque el isotipo IgG resulta preferente. La subclase de IgG puede ser cualquier subclase de IgG1, IgG2 e IgG4.

Además, el segundo polipéptido puede incluir un dominio bisagra de cada isotipo/subclase de inmunoglobulina, o un dominio bisagra que presenta una adición, eliminación o sustitución de una parte de su secuencia de aminoácidos. Un dominio bisagra de isotipo/subclase idéntica a Fc y un dominio bisagra que presenta una sustitución de residuo de aminoácido puede resultar preferente. Además, el dominio bisagra puede extenderse o acortarse para que resulte adecuado para la producción de la proteína heterodímera de la presente invención.

En la presente divulgación, el CL-Fc incluido en el segundo polipéptido puede ser un CL-Fc que presentar cualquier secuencia de aminoácidos con la condición de que resulte adecuado para la producción eficiente y estable de la proteína heterodímera, y preferentemente, un CL-Fc que incluye la adición, eliminación y sustitución de una secuencia de aminoácidos.

Específicamente, puede incluir CL-Fc que incluya por lo menos una sustitución de residuo de aminoácido seleccionada de sustituciones del residuo de aminoácido en la posición 214 por S, el residuo de aminoácido en la posición 220 por S, el residuo de aminoácido en la posición 228 por P, el residuo de aminoácido en la posición 409 por K, el residuo de aminoácido en la posición 435 por R y el residuo de aminoácido en la posición 436 por F, numerados según el índice EU.

El número de residuos de aminoácido que deben sustituirse es de 1 a 15, preferentemente de 1 a 10, más preferentemente de 1 a varios, y todavía más preferentemente de 1 a 5 residuos de aminoácido.

En el caso de la subclase IgG1, pueden proporcionarse a título de ejemplo, CL-Fc que incluye por lo menos una sustitución de residuo de aminoácido seleccionada de C214S, C220S, H435R y Y436F; CL-Fc que incluye una sustitución de residuo de aminoácido de C220S en la posición 220 del índice EU; CL-Fc que incluye una eliminación de EPKSC en las posiciones 216 a 220 según el índice EU, preferentemente CL-Fc que incluye las sustituciones de residuos de aminoácido C214S y H435R y CL-Fc que incluye las sustituciones de residuos de aminoácido C214S, C220S y H435R, y más preferentemente CL-Fc que incluye las sustituciones de residuos de aminoácido C214S, H435R e Y436F, y CL-Fc que incluye las sustituciones de residuos de aminoácido C214S, C220S, H435R y Y436F.

En el caso de la subclase IgG4, puede proporcionarse a título de ejemplo CL que incluye por lo menos una sustitución de residuo de aminoácido seleccionada de C214S, S228P, L235E, R409K, H435R y Y436F, preferentemente CL-Fc que incluye las sustituciones de residuos de aminoácido C214S y H435R, y CL-Fc que incluye las sustituciones de residuos de aminoácido C214S, R409K y H435R, más preferentemente CL que incluye las sustituciones de residuo de aminoácido C214S, R409K, H435R y Y436F, y todavía más preferentemente CL que incluye las sustituciones de residuos de aminoácido C214S, S228P, L235E, R409K, H435R y Y436F.

En la presente invención, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo secretado por células productoras de anticuerpos de un único clon. El anticuerpo monoclonal reconoce únicamente un solo epítipo (asimismo denominado determinante antigénico) y la secuencia de aminoácidos (estructura primaria) que constituye el anticuerpo monoclonal es la misma.

Entre los ejemplos del epítipo puede incluirse una sola secuencia de aminoácidos reconocida y unida a un anticuerpo monoclonal, una conformación de la secuencia de aminoácidos, una secuencia de aminoácidos unida a un residuo de modificación, tal como una cadena de azúcar, un grupo amino, un grupo carboxilo, fosfato, sulfato o similar, y una conformación de la secuencia de aminoácidos unida al residuo de modificación. La conformación es una estructura tridimensional natural de una proteína y se refiere a una conformación de proteínas que se expresan dentro de las células o sobre la membrana celular.

En la presente invención, la molécula de anticuerpo asimismo se denomina inmunoglobulina (en adelante, se denomina Ig) y los anticuerpos humanos se clasifican en los isotipos IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM, basándose en las diferencias de estructura molecular. IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 que presentan una homología relativamente elevada de las secuencias de aminoácidos se denominan genéricamente IgG.

La molécula de anticuerpo está compuesta por polipéptidos, denominados cadena pesada (en adelante se

denomina 'cadena H') y cadena ligera (en adelante se denomina 'cadena L').

Además, la cadena H está constituida por regiones de una región variable de cadena H (asimismo denominada 'VH') y una región constante de cadena H (asimismo denominada 'CH') desde su extremo N, y la cadena L está constituida por regiones de una región variable de cadena L (asimismo denominada 'VL') y una región constante de cadena ligera (asimismo denominada 'CL') desde su extremo N. Con respecto a CH, se conocen cadenas α , δ , ϵ , γ y μ para cada subclase. Con respecto a CL, se conocen λ y κ .

Un dominio se refiere a una unidad estructural funcional que constituye cada polipéptido de las moléculas de anticuerpos. Además, Fc y la región Fc de la presente invención se refieren a una secuencia parcial y a una estructura parcial de región constante de cadena H compuesta por dominio bisagra, dominio CH2 y dominio CH3.

Además, CH está compuesto por dominio CH1, dominio bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 desde el extremo N. El dominio CH1, dominio bisagra, dominio CH2, dominio CH3 y región Fc en la presente invención pueden identificarse por el número de residuos de aminoácido desde el extremo N según el índice EU [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)].

Específicamente, se identifica CH1 por la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 118 y 215 según el índice EU; la bisagra se identifica por la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 216 a 230 según el índice EU; CH2 se identifica por la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 231 a 340 según el índice EU, y CH3 se identifica por la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 341 y 447 según el índice EU, respectivamente.

CL-Fc está compuesto por dominio CL, dominio bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 desde el extremo N. CL-Fc en la presente invención puede identificarse mediante el número de residuos de aminoácido a partir del extremo N según el índice EU [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)].

Específicamente, se identifica CL de CL-Fc por la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 108 y 214 de la cadena L definida por Kabat et al.; Fc de CL-Fc se identifica como la bisagra de la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 216 y 230 según el índice EU; CH2 de la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 231 a 340 según el índice EU, y CH3 se identifica por la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 341 y 447 según el índice EU, respectivamente.

En la presente invención, el anticuerpo incluye anticuerpos recombinantes producidos mediante una tecnología recombinante, así como anticuerpos monoclonales obtenidos a partir de hibridomas. Entre los anticuerpos recombinantes se incluye un anticuerpo quimérico que se prepara mediante la unión de una región constante de anticuerpo humano a una región variable de anticuerpo no humano, un anticuerpo humanizado (o anticuerpo con injerto de CDR) que se prepara mediante el injerto de la región determinante de complementariedad (en adelante abreviado a 'CDR') de la cadena H y de la cadena L de una región variable de anticuerpo no humano (en adelante abreviado a 'FR') de una región variable de anticuerpo humano, y un anticuerpo humano que se prepara mediante la utilización de un animal producto de anticuerpos humanos, o similar.

El anticuerpo quimérico puede producirse mediante la obtención de ADNc codificantes de VH y VL a partir de un hibridoma productor de anticuerpos monoclonales derivado de un animal no humano, insertándolos en un vector de expresión para células animales que presentan ADN codificante de CH y CL de anticuerpo humano, construyendo de esta manera un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano, e introduciendo después el vector en una célula animal para expresar de esta manera el anticuerpo.

El anticuerpo humanizado se refiere a un anticuerpo en el que se injerta la secuencia de aminoácidos de las CDR de VH y VL de un anticuerpo animal no humano, en las CDR correspondientes de VH y VL de un anticuerpo humano. La región aparte de las CDR de VH y VL se denomina región marco (en adelante, 'FR').

El anticuerpo humanizado puede producirse de la manera siguiente: se construye un ADNc codificante de una secuencia de aminoácidos de VH que consiste en una secuencia de aminoácidos de CDR de VH de un anticuerpo no humano y una secuencia de aminoácidos de FR de VH de cualquier anticuerpo humano, y ADNc codificante de una secuencia de aminoácidos de VL que consiste en una secuencia de aminoácidos de CDR de VL de un anticuerpo animal no humano y una secuencia de aminoácidos de FR de VL de cualquier anticuerpo humano; estos ADNc se insertan en vectores de expresión para células animales que presentan ADN codificante de CH y CL de un anticuerpo humano, respectivamente, de manera que se construye un vector de expresión de anticuerpo humanizado, y este vector se introduce en células animales para expresar de esta manera el anticuerpo.

El anticuerpo humano originariamente se refiere a un anticuerpo naturalmente presente en el cuerpo humano. Sin embargo, el anticuerpo humano incluye además anticuerpos que se obtienen de una biblioteca fágica de anticuerpos humanos, clonando los linfocitos de sangre periférica humana inmortalizados, o animales transgénicos productores de anticuerpos humanos, preparados gracias a los avances de las técnicas de ingeniería genética, ingeniería celular e ingeniería del desarrollo de los últimos años.

El anticuerpo humano puede obtenerse mediante inmunización de un ratón que presenta genes de inmunoglobulina humana (Tomizuka K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97:722-7, 2000) con un antígeno deseado. Además, mediante la selección de un anticuerpo humano que presenta una actividad de unión deseada utilizando una biblioteca de expresión fágica que se forma mediante amplificación de genes de anticuerpo a partir de células B humanas, resulta posible obtener anticuerpos humanos sin llevar a cabo inmunización (Winter G. et al., Annu. Rev. Immunol. 12: 433-55, 1994).

Además, mediante la immortalización de células B humanas utilizando un virus EB para preparar células productoras de anticuerpos humanos con una actividad de unión deseada, resulta posible obtener anticuerpos humanos (Rosen A. et al., Nature 267:52-54, 1977).

El anticuerpo existente en el cuerpo humano puede purificarse de la manera siguiente, por ejemplo: linfocitos aislados a partir de sangre periférica humana se immortalizan mediante infección con el virus EB o similar, seguido de la clonación, de manera que se cultivan linfocitos productores del anticuerpo y el anticuerpo puede purificarse a partir del cultivo.

La biblioteca fágica de anticuerpos humanos es una biblioteca de fagos que se causa que expresen fragmentos de anticuerpos, tales como Fab y scFv, sobre la superficie de los mismos mediante la inserción de genes de anticuerpos preparados a partir de células B humanas en el gen del fago. A partir de dicha biblioteca resulta posible recuperar fagos que expresan fragmentos de anticuerpos con una actividad de unión a antígeno deseada, mediante la utilización de la actividad de unión con respecto a un sustrato con antígeno inmovilizado a modo de índice. Los fragmentos de anticuerpo asimismo pueden convertirse en una molécula de anticuerpo humano que consiste en dos cadenas H completas y dos cadenas L completas mediante técnicas de ingeniería genética.

El animal transgénico producto de anticuerpos humanos se refiere a un animal producido mediante la integración del gen de anticuerpo humano en los cromosomas de un animal huésped. Específicamente, el gen de anticuerpo humano se introduce en células ES de ratón, las células ES se injertan en el embrión temprano de otro ratón y después el embrión se desarrolla, de manera que puede producirse un animal transgénico producto del anticuerpo humano.

Como método de preparación de anticuerpos humanos a partir del animal transgénico producto de anticuerpos humanos, se obtiene un hibridoma producto de anticuerpo humano mediante un método normal de preparación de hibridoma que se implementa utilizando un mamífero diferente de un ser humano, seguido del cultivo, de manera que los anticuerpos humanos pueden producirse y acumularse en el cultivo.

Las secuencias de aminoácidos de VH y VL unidos a la proteína heterodímera de la presente invención pueden ser cualesquiera secuencias de aminoácidos de VH y VL de un anticuerpo humano, secuencias de aminoácidos de VH y VL de un anticuerpo animal no humano, una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humanizado que se prepara mediante injerto de CDR de un anticuerpo animal no humano en el marco de un anticuerpo humano, y secuencias de aminoácidos de VH y VL derivadas de un anticuerpo humano.

Específicamente, puede incluir secuencias de aminoácidos de VH y VL de un anticuerpo animal no humano, de un anticuerpo humanizado y de un anticuerpo humano que se producen mediante hibridomas o células productoras de anticuerpos.

La secuencia de aminoácidos de CL en la proteína heterodímera de la presente invención puede ser cualquiera de entre la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano o la secuencia de aminoácidos del anticuerpo animal no humano. La secuencia de aminoácidos de C_κ o C_λ del anticuerpo humano resulta preferente.

CH en la proteína heterodímera de la presente invención puede ser cualquiera perteneciente a las inmunoglobulinas. Preferentemente, puede utilizarse cualquiera de $\gamma 1$ (IgG1), $\gamma 2$ (IgG2) y $\gamma 4$ (IgG4), pertenecientes a la clase IgG humana.

En la presente invención, el fragmento de anticuerpo puede incluir Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, diacuerpo, dsFv, un péptido que comprende una pluralidad de CDR y, preferentemente, un péptido que comprende 6 CDR de un anticuerpo, o similar.

Fab se refiere a un fragmento de anticuerpo que presenta aproximadamente una media cadena H del extremo N y una cadena L completa que están unidas entre sí mediante un enlace disulfuro (enlace S-S), un peso molecular de aproximadamente 50000 y una actividad de unión a antígeno, entre fragmentos (cortados en la posición 224 del residuo de aminoácido de la cadena H) que se obtienen mediante tratamiento del anticuerpo IgG con la proteasa papaína.

F(ab')₂ se refiere a un fragmento de anticuerpo que es ligeramente más largo que Fab unidos entre sí mediante un enlace S-S- de la región de bisagra y presenta un peso molecular de aproximadamente 100,000 y una actividad

de unión a antígeno, entre fragmentos (cortados en la posición 234 del residuo de aminoácido de la cadena H) que se obtienen mediante tratamiento de IgG con la proteasa pepsina.

Fab' es un fragmento de anticuerpo que se obtiene mediante corte del enlace S-S de la región bisagra de F(ab')₂ y presenta un peso molecular de aproximadamente 50,000 y una actividad de unión a antígeno.

scFv es un fragmento de anticuerpo que presenta una actividad de unión a antígeno, que es un polipéptido VH-P-VL o VL-P-VH obtenido mediante la unión de un VH a un VL mediante la utilización de un conector peptídico apropiado (P), tal como un péptido conector preparado mediante la unión de un número arbitrario de conectores (G₄S) que consisten en 4 residuos de Gly y 1 residuo de Ser.

Un diacuerpo es un fragmento de anticuerpo en forma de dímero formado de scFv que muestra una especificidad de unión a antígeno igual o diferente, y este fragmento de anticuerpo presenta una actividad de unión a antígeno divalente con respecto al mismo antígeno o presenta 2 tipos de actividad de unión a antígeno específico con respecto a diferentes tipos de antígeno.

dsFv es uno en el que se sustituye 1 residuo de aminoácido en cada uno de VH y VL por un residuo de cistina, y los polipéptidos se unen mediante un enlace S-S entre estos residuos de cisteína.

El péptido que comprende CDR es constitutivo con por lo menos una o más regiones de CDR de VH o VL. En el péptido que comprende una pluralidad de CDR, las CDR pueden unirse entre sí directamente o mediante un conector peptídico apropiado.

Puede prepararse mediante la construcción de ADN codificantes de CDR de VH y VL de la proteína heterodímera de la presente invención, insertando dichos ADN en un vector de expresión para procariotas o eucariotas, e introduciendo dicho vector de expresión en un procariota o eucariota para la expresión. El péptido que comprende CDR asimismo puede prepararse mediante un método de síntesis química, tal como un método de Fmoc o un método de tBoc.

La proteína heterodímera de la presente invención puede ser cualquier proteína heterodímera según se reivindica, en la que dos regiones variables de anticuerpo formadas por el primer polipéptido y el segundo polipéptido se unen a diferentes epítomos, y una proteína heterodímera, en la que dos regiones variables de anticuerpo se unen al mismo epítomo, respectivamente.

Además, una proteína heterodímera según se reivindica que comprende una proteína de unión que se une adicionalmente a por lo menos a un extremo C de CH y CL-Fc anteriormente indicados y la unión a dos o más epítomos asimismo se encuentra incluida en la presente invención.

2. Control de la actividad de la proteína heterodímera.

(1) Control de la actividad efectora.

Debido a que el heterodímero de la presente invención presenta una región Fc compuesta por dominio bisagra, dominio CH2 y dominio CH3, asimismo puede proporcionarse una actividad efectora dependiente de la región Fc de la proteína heterodímera. La actividad efectora del heterodímero de la presente invención puede controlarse mediante diversos métodos.

La actividad efectora se refiere a una actividad dependiente de anticuerpos que está mediada por la región Fc de un anticuerpo. Como actividad efectora, se conoce la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (actividad de ADCC), la actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (actividad de CDC) y la fagocitosis dependiente de anticuerpos (actividad de ADP) causada por fagocitos, tales como macrófagos, células dendríticas o similares. En la presente invención, las actividades de ADCC y CDC pueden medirse utilizando métodos de medición conocidos [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373, 1933].

La actividad de ADCC se refiere a una actividad en la que un anticuerpo que se une a un antígeno sobre una célula diana se une a un receptor de Fc de un inmunocito mediante la región Fc del anticuerpo, activando de esta manera el inmunocito (una célula asesina natural o similar) y dañando la célula diana.

El receptor de Fc (en adelante denominado FcR en algunos casos) se refiere a un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo e induce diversos tipos de actividad efectora debido a la unión de un anticuerpo.

FcR corresponde a subclases de anticuerpo e IgG, IgE, IgA e IgM se unen específicamente a FcγR, FcεR, FcαR y FcμR respectivamente. FcγR presenta subtipos, incluyendo FcγRI(CD64), FcγRII(CD32) y FcγRIII(CD16), y los subtipos respectivamente presentan isoformas, incluyendo FcγRIA, FcγRIB, FcγRIC, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA y FcγRIIIB. Estos diferentes tipos de FcγR existen sobre células diferentes [Annu. Rev. Immunol. 9:457-492, 1991].

En los seres humanos, FcγRIIIB se expresa específicamente en neutrófilos, y FcγRIIIA se expresa en monocitos, linfocitos citolíticos naturales (linfocitos NK) y una parte de las células T. La unión a anticuerpo causada mediante FcγRIIIA induce actividad de ADCC dependiente de linfocitos NK.

La actividad de CDC se refiere a una actividad en la que un anticuerpo que se une a un antígeno sobre una célula diana activa una serie de cascadas (rutas de activación del complemento) que consiste en un grupo de proteínas relacionadas con el complemento en la sangre, dañando de esta manera la célula diana. Mediante los fragmentos de proteína generados debido a la activación del complemento resulta posible inducir la migración y activación de

Al unirse C1q que presenta un dominio de unión para la región Fc de un anticuerpo, a la región Fc y C1r y C1s como dos serina proteasas se unen a la misma, se forma un complejo C1, de manera que se inicia la cascada de actividad de CDC.

El método para controlar la actividad efectora de la proteína heterodímera de la presente invención puede ejemplificarse de la manera siguiente.

Entre los ejemplos de métodos para controlar la actividad efectora de la proteína heterodímera puede incluirse un método para controlar la cantidad de fucosa (asimismo denominada fucosa nuclear) que forma enlaces α1,6 a la N-acetilglucosamina (GlcNAc) presente en un extremo reductor de una cadena de azúcar unida a N de tipo complejo (en adelante abreviados simplemente como cadena de azúcar compleja en algunos casos) que se une a Asn en la posición 297 según índice EU utilizando la secuencia de aminoácidos de Fc de subclase IgG1 como Fc de la proteína heterodímera de la presente invención (documentos nº WO 2005/035586, nº WO 2002/31140 y nº WO 00/61739), o un método para controlar la actividad mediante la sustitución de residuos de aminoácido de la región Fc del anticuerpo.

1) Control de la actividad efectora mediante modificación de las cadenas de azúcar.

La actividad efectora de la proteína heterodímera puede incrementarse o reducirse mediante el control del contenido de fucosa que se añade a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar compleja unida a la región Fc de la proteína heterodímera.

El método para reducir el contenido de fucosa que se une a la cadena de azúcar unida a N de tipo complejo unida a la región Fc de la proteína heterodímera es obtener la proteína heterodímera sin unión de fucosa a la misma mediante la expresión de un anticuerpo utilizando células CHO en las que se ha eliminado el gen de α1,6-fucosiltransferasa (FUT8). La proteína heterodímera sin unión de fucosa a la misma presenta una actividad de ADCC elevada.

Por otra parte, el método de incrementar el contenido de fucosa unido a la cadena de azúcar unida a N de tipo complejo unida a la región Fc de la proteína heterodímera es obtener la proteína heterodímera sin unión de fucosa a la misma mediante la expresión de la proteína heterodímera utilizando una célula hospedadora en la que se ha introducido el gen de α1,6-fucosiltransferasa. La proteína heterodímera con unión de fucosa a la misma presenta una actividad de ADCC más baja que la proteína heterodímera sin fucosa unida a la misma.

En la región Fc de la proteína heterodímera de la presente invención, la cadena de azúcar unida a N se une al residuo Asn en la posición 297 según el índice EU, aunque no se ha informado de unión de la cadena de azúcar al residuo Asn de otra región Fc. Por lo tanto, típicamente se unen dos cadenas de azúcar unidas a N conocidas a una molécula de la proteína heterodímera.

Las cadenas de azúcar unidas a N conocidas son cadenas de azúcar de tipo ricas en manosa, de tipo complejo y de tipo híbrido. En el caso de que la cadena de azúcar unida a N no presente fucosa unida a la misma, presentará una actividad de ADCC más elevada que la cadena de azúcar sin fucosa unida a la misma.

La cadena de azúcar de tipo complejo unida a la región Fc de la proteína heterodímera de la presente invención puede incluir una cadena de azúcar en la que uno o más de N-acetilglucosamina (GlcNAc) o galactosa-N-acetilglucosamina (en adelante denominado Gal-GlcNAc) están unidas mediante enlace α1-2- o α1-4 a manosa (Man) en el extremo no reductor de la estructura nuclear (estructura nuclear trimanosilo).

Puede incluir además una cadena de azúcar de tipo complejo que presenta ácido siálico, N-acetilglucosamina bisectada (en adelante denominada GlcNAc bisectada) o similar en el extremo no reductor de Gal-GlcNAc.

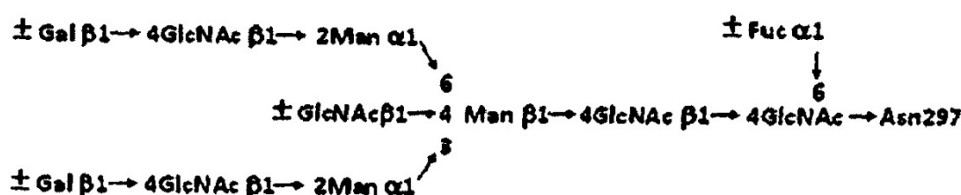
En la presente invención, la fucosa nuclear o α1,6-fucosa se refiere a una estructura de cadena de azúcar en la que la posición 1 de fucosa (en adelante denominada Fuc en algunos casos) está unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina (en adelante denominada GlcNAc en algunos casos) en el extremo reductor mediante enlace α de una cadena de azúcar unida mediante N-glucósido de tipo complejo. Además, las que no presentan fucosa

nuclear unida a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo se denominan simplemente cadenas de azúcar sin fucosa o sin fucosa nuclear.

En la presente invención, la estructura nuclear o la estructura del núcleo trimanosilo se refiere a una estructura $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$.

Como cadena de azúcar unida a la proteína heterodímera de la presente invención, una cadena de azúcar compleja unida a N-glucósido biantenarico (asimismo denominada cadena de azúcar compleja biantenaria) se representa mediante la fórmula química a continuación.

[Fórmula química 1]



La composición de proteína heterodímera de la presente invención es una molécula de proteína heterodímera según se reivindica, en la que en la región Fc la cadena de azúcar de tipo complejo está unida a Asn en la posición 297 de la molécula de proteína heterodímera y con la condición de que presente la estructura sacárida anteriormente indicada, puede estar compuesta por moléculas de proteína heterodímera que presentan una o una pluralidad de diferentes cadenas de azúcar.

En otras palabras, la composición de proteína heterodímera de la presente invención se refiere a una composición que está compuesta por moléculas de proteína heterodímera según se reivindica que presentan una o una pluralidad de diferentes cadenas de azúcar y, específicamente, una proteína heterodímera en la que la cadena de azúcar sin fucosa unida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar entre el total de cadenas de azúcar unidas a N-glucósido ligadas a la región Fc incluida en la proteína heterodímera es de 20% o más.

La proporción entre la cadena de azúcar sin fucosa nuclear puede ser cualquier proporción en la composición de proteína heterodímera con la condición de que la actividad de ADCC de la proteína heterodímera esté incrementada. La proporción puede ser preferentemente de 20% o más, más preferentemente de 51% a 100%, mucho más preferentemente de 80% a 100%, particularmente preferentemente de 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y todavía más preferentemente de 100%.

La composición de proteína heterodímera que presenta 50% de proporción de cadena de azúcar sin fucosa nuclear puede ser cualquiera de una composición de proteína heterodímera que comprende 100% de moléculas sin fucosa en una cadena de azúcar de las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido ligadas al primer y segundo polipéptidos de la molécula de proteína heterodímera, y una composición de proteína heterodímera que comprende 50% de moléculas sin fucosa en ambas cadenas de azúcar de las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido ligadas al primer y segundo polipéptidos de la molécula de proteína heterodímera y 50% de moléculas con fucosa en ambas cadenas de azúcar de las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido ligadas al primer y segundo polipéptidos de la molécula de proteína heterodímera.

En la presente invención, la cadena de azúcar sin fucosa puede presentar cualquier estructura de la cadena de azúcar en el extremo no reductor, con la condición de que la fucosa no se una a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor en la fórmula química anteriormente proporcionada.

En la presente invención, ninguna fucosa (ninguna fucosa nuclear) unida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar se refiere a que la fucosa no está sustancialmente unida. La composición de proteína heterodímera en la que “la fucosa no se encuentra sustancialmente unida” se refiere a una composición de proteína heterodímera en la que la fucosa no puede detectarse sustancialmente en el análisis de cadenas de azúcar indicado posteriormente. La expresión “la fucosa no puede detectarse sustancialmente” se refiere a que es inferior al límite de detección. La composición de proteína heterodímera sin fucosa nuclear en la totalidad de las cadenas de azúcar presenta la actividad de ADCC más elevada.

La proporción de moléculas de proteína heterodímera que presentan cadenas de azúcar sin fucosa contenida en la composición que está compuesta por una molécula de proteína heterodímera que presenta la región Fc unida a cadenas de azúcar unidas a N-glucósido de tipo complejo puede determinarse mediante la liberación de las cadenas de azúcar respecto de la molécula de proteína heterodímera utilizando un método conocido, tal como la hidrazinólisis o la digestión enzimática [Biochemical Experimentation Methods 23-Method for Studying Glycoprotein

Sugar Chain (Japan Scientific Societies Press), editado por Reiko Takahashi, 1989], llevando a cabo el marcaje de fluorescencia o el marcaje de isótopos radioactivos de las cadenas de azúcar liberadas y separando después las cadenas de azúcar marcadas mediante cromatografía.

5 Además, la proporción de moléculas de proteína heterodímera unidas a cadenas de azúcar sin fucosa contenidas en la composición que está compuesta por una molécula de proteína heterodímera que presenta la región Fc unida a cadenas de azúcar de tipo complejo puede determinarse mediante el análisis de las cadenas de azúcar liberadas mediante el método HPAED-PAD [J. Liq. Chromatogr., 6, 1577, 1983].

10 2) Control de la actividad efectora mediante sustitución de los residuos de aminoácido.

Las actividades de ADCC, ADCP y CDEC de la proteína heterodímera de la presente invención puede incrementarse o reducirse modificando la subclase de anticuerpo de Fc que constituye la proteína heterodímera o mediante sustitución de los residuos de aminoácido de Fc.

15 Por ejemplo, puede incrementarse la actividad de CDC del anticuerpo mediante la utilización de la secuencia de aminoácidos de la región Fc, que se describe en la solicitud publicada de patente US nº 2007/0148165. Además, la actividad de ADCC o de CDC de la proteína heterodímera puede incrementarse o reducirse llevando a cabo la sustitución de los residuos de aminoácido, que se describe en las patentes US nº 6.737.056, nº 7.297.775 y
20 nº 7.317.091.

Entre las sustituciones de residuos de aminoácido específicos para incrementar la actividad de ADCC pueden incluirse P247I, A339D, F243L, R292P, Y300L, P396L, T393A, H433P, S239D, S298A, A330L, I332E, E333A, K334A o similares. Por otra parte, entre las sustituciones de residuos de aminoácido específicos para reducir la
25 actividad de ADCC pueden incluirse L235E, P238A, N297A, K322A, P331S o similares.

Entre las sustituciones de residuos de aminoácido para incrementar la actividad de CDC pueden incluirse por lo menos una sustitución de residuo de aminoácido seleccionado de K326A, S267E, H268F, S324T, K274Q, N276K, Y296F, Y300F, K326W, K326Y, E333A, E333S, A339T, D356E, L358M, N384S, K392N, T394F, T394Y, V397M y
30 V422I.

La actividad de CDC puede incrementarse en combinaciones de dos o más sustituciones de residuos de aminoácido y los residuos de aminoácido que deben sustituirse pueden incrementarse según el propósito. Preferentemente, la sustitución de residuos de aminoácido para incrementar la actividad de CDC puede incluir por
35 lo menos una sustitución de residuo de aminoácido seleccionada de N276K, A339T, T394F y T394Y, sustituciones de residuos de aminoácido de entre N276K y A339S y sustituciones de residuos de aminoácido de entre K274Q, N276K, Y296F, Y300F, A339T, D356E, L358M, N384S, V397M y V422I o similares. Por otra parte, entre las sustituciones de residuos de aminoácido específicos para reducir la actividad de CDC pueden incluirse L235E, N297A, K322A, P329A y P331S, o similares.

40 La semivida en sangre asimismo puede prolongarse mediante la introducción de las mutaciones de aminoácidos T250Q, M428L, M252Y, S254T, T256E, o similares en Fc de la subclase IgG1 humana. La citotoxicidad celular, tal como la actividad de ADCC, la actividad de ADCP, la actividad de CDC, asimismo pueden reducirse mediante la utilización de Fc en el que se ha eliminado la cadena de azúcar unida a N, mediante la introducción de una mutación
45 de aminoácido en la posición N297, Fc de subclase IgG2 o IgG4 humana, Fc quimérica de IgG2 e IgG4, o similar.

Además, la actividad de unión al receptor de Fc inhibidor FcγRIIb puede incrementarse mediante la introducción de una mutación de aminoácido G236D, L328F, S239D, S267E o similar en la IgG1 humana.

50 La proteína heterodímera de la presente invención incluye cualquiera de las proteínas heterodímeras según se reivindica que presentan una actividad efectora incrementada o reducida indicada anteriormente.

Específicamente, la proteína heterodímera de tipo IgG1 de la presente invención puede ser una proteína heterodímera según se reivindica compuesta por primer polipéptido que comprende CH del anticuerpo IgG1 y
55 segundo polipéptido que comprende Fc y CL de IgG1, y asimismo cualquiera de las proteínas heterodímeras de tipo IgG1 de (1) a (9), a continuación.

(1) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido incluye una sustitución C220S según índice EU y el segundo polipéptido incluye una sustitución H435R,

60 (2) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido no incluye ninguna sustitución de aminoácido y el segundo polipéptido incluye las sustituciones C214S y H435R,

(3) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido incluye una sustitución C220S según índice EU y el segundo polipéptido incluye sustituciones C214S y H435R,

- (4) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido incluye una sustitución C220S según índice EU y el segundo polipéptido incluye las sustituciones C220S, C214S y H435R,
- (5) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido incluye una sustitución C220S según índice EU y el segundo polipéptido incluye una sustitución C214S y H435R y una eliminación de EPKSC de 216-220 según índice EU,
- (6) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido incluye una sustitución C220S según índice EU y el segundo polipéptido incluye las sustituciones C214S, H435R y Y436F,
- (7) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido incluye una sustitución C220S según índice EU y el segundo polipéptido incluye las sustituciones C214S, H435R, Y436F y una eliminación de EPKSC de 216 a 220 según el índice de EU,
- (8) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido incluye las sustituciones C220S, K322A y P331S según índice EU y el segundo polipéptido incluye las sustituciones C214S, K322A, P331S, H435R e Y436F y una eliminación de EPKSC de 216 a 220 según índice EU,
- (9) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido incluye las sustituciones C220S e I332E según índice EU y el segundo polipéptido incluye las sustituciones C214S, I332E, H435R e Y436F y una eliminación de EPKSC de 216 a 220 según índice EU.

Específicamente, la proteína heterodímera de tipo IgG4 de la presente invención puede ser una proteína heterodímera según se reivindica compuesta por primer polipéptido que comprende CH del anticuerpo IgG4 y segundo polipéptido que comprende Fc y CL de IgG4, y asimismo cualquiera de las proteínas heterodímeras de tipo IgG4 de (1) a (10), a continuación.

- (1) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido incluye una sustitución C131S según índice EU y el segundo polipéptido incluye sustituciones C214S y H435R,
- (2) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido incluye una sustitución C131S según índice EU y el segundo polipéptido incluye las sustituciones C214S, H435R y Y436F,
- (3) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido incluye las sustituciones C131S y R409K según índice EU y el segundo polipéptido incluye las sustituciones C214S, R409K, H435R e Y436F,
- (4) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido incluye las sustituciones C131S, S228P y R409K según índice EU y el segundo polipéptido incluye las sustituciones C214S, S228P, R409K, H435R y Y436F,
- (5) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido incluye las sustituciones C131S, S228P, L235E y R409K según índice EU y el segundo polipéptido incluye las sustituciones C214S, S228P, L235E, R409K, H435R y Y436F,
- (6) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido incluye las sustituciones C131S y R133K según índice EU y el segundo polipéptido incluye las sustituciones C214S y H435R,
- (7) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido incluye las sustituciones C131S y R133K según índice EU y el segundo polipéptido incluye las sustituciones C214S, H435R y Y436F,
- (8) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido incluye las sustituciones C131S, R133K y R409K según índice EU y el segundo polipéptido incluye las sustituciones C214S, R409K, H435R y Y436F,
- (9) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido incluye las sustituciones C131S, R133K, S228P y R409K según índice EU y el segundo polipéptido incluye las sustituciones C214S, S228P, R409K, H435R y Y436F,
- (10) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido incluye las sustituciones C131S, R133K, S228P, L235E y R409K según índice EU y el segundo polipéptido incluye las sustituciones C214S, S228P, L235E, R409K, H435R y Y436F.

(2) Control de la actividad de unión de la proteína heterodímera.

La proteína heterodímera de la presente invención puede prepararse en una proteína heterodímera que presenta una actividad monovalente a tetravalente mediante la conexión de una proteína de unión específica de una

molécula al extremo N y al extremo C de cada polipéptido de CH y CL-Fc (en adelante, proteína de andamiaje heterodímero, denominada HSP en algunos casos) que constituye la molécula heterodímero.

Por lo tanto, la proteína heterodímera de la presente invención puede ser una proteína heterodímera que comprende HSP compuesta por CH y CL-Fc, en la que por lo menos una proteína de unión se encuentra unida a HSP (Figura 2A y 2B).

La proteína heterodímera que presenta un dominio de unión monovalente de la presente invención (en adelante, denominado anticuerpo monovalente o anticuerpo monomérico en algunos casos) puede incluir un anticuerpo monovalente según la presente invención compuesto por un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en el que VH y VL están unidos al extremo N de CH y CL-Fc, respectivamente, y un anticuerpo monovalente compuesto por un primer polipéptido en el que scFv se encuentra unido al extremo N de CH y un segundo polipéptido de CL-Fc.

La proteína heterodímera que presenta un dominio de unión divalente de la presente invención (en adelante, denominado anticuerpo biepecífico o anticuerpo divalente en algunos casos) puede incluir un anticuerpo biepecífico según la presente invención compuesto por un primer polipéptido y un segundo polipéptido, en el que un primer scFv y un segundo scFv están unidos al extremo N de CH y CL-Fc, respectivamente, y un anticuerpo biepecífico compuesto por un primer polipéptido en el que VH está unido al extremo N de CH y scFv está unido al extremo C del mismo, y un segundo polipéptido en el que VL está unido al extremo terminal de CL-Fc (Figura 2B). Además, puede incluir una proteína heterodímera que presenta una actividad de unión divalente en la que scFv está unido al extremo N del anticuerpo monovalente anteriormente indicado.

La proteína heterodímera que presenta un dominio de unión trivalente o tetravalente de la presente invención (en adelante denominado anticuerpo trivalente o tetravalente en algunos casos) puede incluir un anticuerpo trivalente o tetravalente según la presente invención en el que se encuentran unidos tres a cuatro scFv al extremo N y al extremo C de CH y CL-Fc. Además, puede incluir una proteína heterodímera que presenta una actividad de unión trivalente en la que el primer scFv y el segundo scFv están unidos al extremo N del anticuerpo monovalente anteriormente indicado.

Debido a que el anticuerpo monovalente de la presente invención se une a un epítipo, no causa un efecto tal como el enlace cruzado de antígenos y no causa actividades innecesarias relacionadas con el enlace cruzado de antígenos.

En adelante, el método de preparación de la composición de proteína heterodímera de la presente invención se describe en detalle a continuación.

3. Método de preparación de composición de proteína heterodímera.

El método de preparación de la proteína heterodímera de la presente invención puede ser un método de preparación que comprende los procedimientos (i) a (iii) a continuación.

(i) Un procedimiento de introducción en células de un vector que incluye ADN codificante del primer polipéptido que comprende CH y un vector que incluye ADN codificante del segundo polipéptido que comprende CL-Fc que presenta una actividad de unión reducida al ligante de CH.

(ii) Un procedimiento de cultivo de las células y la recuperación del sobrenadante de cultivo.

(iii) Un procedimiento de unión de la proteína heterodímera al ligante de CH para la purificación.

Más específicamente, por ejemplo, en el procedimiento de preparación de las células de producción para la preparación de la proteína heterodímera de (1) indicada anteriormente, se lleva a cabo apropiadamente según la subclase de región constante de anticuerpo incluida en la proteína heterodímera, un procedimiento de adición de una sustitución C131S según el índice EU al primer polipéptido y una adición de cualquier sustitución seleccionada de las sustituciones C214S, C220S y las sustituciones H435R e Y436F según el índice EU al segundo polipéptido.

Más específicamente, puede ejemplificarse un procedimiento de adición de una sustitución C131S según el índice EU al primer polipéptido y una sustitución H435R según el índice EU al segundo polipéptido, la adición de las sustituciones C214S y H435R según el índice EU, las sustituciones C220S y H435R según el índice EU, o las sustituciones C214S, H435R e Y436F según el índice EU, al segundo polipéptido.

Además, el método de preparación de la proteína heterodímera de la presente invención puede incluir los procedimientos (i) a (v) a continuación.

(i) Un procedimiento de reducción o eliminación de la actividad de unión del segundo polipéptido al ligante de CH en la proteína heterodímera compuesta por el primer polipéptido que comprende CH y el segundo polipéptido que comprende CL-Fc.

(ii) Un procedimiento de eliminación o sustitución de los residuos Cys que participan en enlaces disulfuro entre CH y CL de la proteína heterodímera.

(iii) Un procedimiento de introducción en células de un vector que incluye ADN codificante del primer polipéptido que comprende CH y un vector que incluye ADN codificante del segundo polipéptido que comprende CL-Fc que presenta una actividad de unión reducida al ligante de CH.

(iv) Un procedimiento de cultivo de las células y la recuperación del sobrenadante de cultivo.

(v) Un procedimiento de unión de la proteína heterodímera al ligante de CH para la purificación.

La composición de proteína heterodímera de la presente invención puede obtenerse mediante su expresión en una célula hospedadora utilizando los métodos indicados en Molecular Cloning, segunda edición, Current protocols in molecular biology, Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, Monoclonal Antibodies: principles and practice, tercera edición, Acad. Press, 1993, Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996 o similares, por ejemplo, de la manera siguiente.

(1) Construcción de vector de expresión para la composición de proteína heterodímera de la presente invención.

El vector de expresión para la composición de proteína heterodímera de la presente invención es un vector de expresión para células animales en el que se introducen genes codificantes del primer polipéptido y el segundo polipéptido de la molécula de proteína heterodímera incluida en la composición de proteína heterodímera de la presente invención.

El vector para expresar la composición de proteína heterodímera puede construirse mediante clonación de cada uno de los genes codificantes del primer y segundo polipéptidos de la molécula de proteína heterodímera incluida en la composición de proteína heterodímera en un vector de expresión para células animales.

El gen codificante del primer polipéptido que constituye la molécula de proteína heterodímera incluida en la composición de proteína heterodímera de la presente invención puede prepararse mediante la preparación de una secuencia de aminoácidos en la que una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión deseada se une al extremo N o C-terminal de la región constante de cadena H (CH) de anticuerpo.

De la misma manera, el gen codificante del segundo polipéptido puede prepararse mediante la preparación de una secuencia de aminoácidos en la que una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión deseada se une al extremo N o al extremo C de CL-Fc preparada mediante fusión de la región constante de cadena IL (CL) de anticuerpo y Fc.

Además, puede sintetizarse el ADN total mediante la utilización de ADN sintéticos y la síntesis utilizando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) asimismo resulta posible (Molecular Cloning, segunda edición). Además, el gen codificante de la proteína heterodímera puede producirse en combinaciones de una pluralidad de dichas técnicas.

Específicamente, en el caso de que se prepare un anticuerpo monovalente de tipo IgG4 que presenta un dominio de unión monovalente como proteína heterodímera de la presente invención, se diseña una secuencia de aminoácidos mediante la adición de las sustituciones de aminoácidos C131S/R133K/S228P/L235E/R409K a la secuencia de aminoácidos de CH del anticuerpo IgG4 humano, y se une la secuencia de aminoácidos de VH al extremo N de la secuencia de aminoácidos de IgG4-CH para preparar una secuencia de aminoácidos del primer polipéptido.

Además, se diseña una secuencia de aminoácidos mediante la adición de las sustituciones de aminoácidos C214S/S228P/L235E/R409K/H435R/Y436F a IgG4-CL-Fc que se prepara mediante la unión de la secuencia de aminoácidos de Clk humana y las secuencias de aminoácidos del dominio bisagra, el dominio CH2 y el dominio CH3 del anticuerpo IgG4 humano, y se prepara una secuencia de aminoácidos del segundo polipéptido en el que la secuencia de aminoácidos de VL se une al extremo N de la secuencia de aminoácidos del mismo. Se preparan las secuencias de nucleótidos de ADN codificantes de las secuencias de aminoácidos preparadas del primer y segundo polipéptidos y se insertan en un vector de expresión para células animales, preparando de esta manera un vector de expresión para el anticuerpo monovalente de la presente invención.

En el caso de que se utilice una célula animal como hospedadora, puede utilizarse cualquier vector de expresión con la condición de que muestre sus funciones en las células animales, y entre los ejemplos de la misma se incluyen pcDNAI, pCDM8 (fabricados por Funakoshi Co.), pAGE107 [publicación de patente japonesa nº H3-22979; Cytotechnology, 3, 133, 1990], pAS3-3 (publicación de patente japonesa nº H2-227075), pCDM8 [Nature, 329, 840, 1987], pcDNAI/Amp (fabricado por Invitrogen), pcDNA 3.1 (fabricado por Invitrogen), pREP4 (fabricado por Invitrogen), pAGE103 [J. Biochemistry, 101, 1307, 1987], pAGE210, pME18SFL3, pKANTEX93 (documento nº WO 97/10354), N5KG1val (patente US nº 6.001.358), vector transposón Tol2 (documento nº WO 2010/143698) o

similares.

Como promotor, puede utilizarse cualquier promotor con la condición de que muestre sus funciones en las células animales, y entre los ejemplos del mismo se incluyen el promotor del gen temprano inmediato (IE) del citomegalovirus (CMV), el promotor temprano del SV40, el promotor de un retrovirus, el promotor de metalotioneína, el promotor de choque térmico, el promotor SR α , el promotor o intensificador del virus de la leucemia murina de Moloney. El intensificador del gen IE del CMV humano asimismo puede utilizarse en combinación con el promotor.

El vector de expresión para la composición de proteína heterodímera de la presente invención puede ser de un tipo en el que la cadena H y la cadena L del anticuerpo existen en vectores separados o de un tipo en el que existen en el mismo vector (en adelante denominado 'tipo tándem').

(3) Adquisición del ADNc codificante de la región variable de anticuerpo

Pueden obtenerse ADNc codificantes de VH y VL de cualquier anticuerpo de la manera siguiente.

Un ADNc se sintetiza mediante la utilización de ARNm como molde, que se extrae de una célula de hibridoma productora de cualquier anticuerpo. El ADNc sintetizado se inserta en un vector, tal como un fago o un plásmido, con el fin de obtener una biblioteca de ADNc.

Cada uno de un fago recombinante o plásmido recombinante que presenta un ADNc codificante de VH y un fago recombinante o plásmido recombinante que presenta un ADNc codificante de la región variable de cadena L se aísla a partir de la biblioteca anteriormente indicada mediante la utilización de ADN codificante de la región constante o región variable de un anticuerpo conocido a modo de la sonda. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de longitud completa de VH y VL del anticuerpo deseado en el fago recombinante o plásmido recombinante, y se dedujeron las secuencias de aminoácidos de longitud completa de VH y VL a partir de las secuencias de nucleótidos.

Las células de hibridoma productoras de cualquier anticuerpo animal no humano pueden obtenerse mediante la inmunización de un animal no humano con un antígeno que se unirá al anticuerpo, y se preparan hibridomas a partir de células productoras de anticuerpos del animal inmunizado y células de mieloma según un método conocido [Molecular Cloning, segunda edición, Current protocols in molecular biology, Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, Monoclonal Antibodies: principles and practice, tercera edición, Acad. Press, 1993, Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996]. Después, se seleccionan hibridomas clonados de células individuales, se cultivan y se purifican a partir del sobrenadante de cultivo.

Como animal no humano, puede utilizarse cualquier animal con la condición de que puedan prepararse células de hibridoma a partir del animal, tal como ratón, rata, hámster, conejo o similar.

Los métodos para preparar el ARN total a partir de una célula de hibridoma pueden incluir, por ejemplo, el método de tiocianato de guanidina-trifluoroacetato de cesio [Methods in Enzymol., 154, 3, 1987] y un kit Rneasy (fabricado por QIAGEN). Los métodos para preparar ARNm a partir del ARN total pueden incluir el método de columna de celulosa con oligo (dT) inmovilizado [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989] o similar.

Además, entre los ejemplos de los kits para preparar ARNm a partir de una célula de hibridoma puede incluirse el kit de aislamiento de ARNm Fast Track (fabricado por Invitrogen), el kit de purificación de ARNm Quick Prep (fabricado por Pharmacia) o similar.

Entre los métodos para sintetizar el ADNc y preparar la biblioteca de ADNc pueden incluirse métodos convencionales (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1-34], o métodos que utilizan kits disponibles comercialmente, por ejemplo, el sistema de plásmidos SuperScript (nombre comercial registrado) para la síntesis de ADNc y la clonación de plásmidos (fabricado por GIBCO BRL), el kit de síntesis de ZAP-ADNc (fabricado por Stratagene) o similares.

En la preparación de la biblioteca de ADNc, el vector para integrar el ADNc que se sintetiza utilizando el ARNm extraído de una célula de hibridoma como molde puede ser cualquier vector, con la condición de que el ADNc pueda integrarse.

Por ejemplo, pueden utilizarse ZAP Express (Strategies, 5, 58, 1992), pBluescript II SK(+) (Nucleic Acids Research, 17, 9494, 1989), λ ZAP II (fabricado por Stratagene), λ gt10, λ gt11 (DNA Cloning: A Practical Approach, 1, 49, 1985), Lambda BlueMid (fabricado por Clontech), λ ExCell, pT7T3 18U (fabricado por Pharmacia), pcD2 (Mol. Cell. Biol., 3, 280, 1983), pUC18 (Gene, 33, 103, 1985) o similares.

Como *Escherichia coli* para introducir la biblioteca de ADNc construida con un vector fago o plásmido, puede utilizarse cualquiera con la condición de que pueda introducirse, expresarse y mantenerse la biblioteca de ADNc.

Por ejemplo, pueden utilizarse XL1-Blue MRF (Strategies, 5,81,1992), C600 (Genetics, 39, 440, 1954), Y1088, Y1090 (Science, 222, 778, 1983), NM522 (Journal of Molecular Biology; J. Mol. Biol., 166, 1, 1983), K802(J. Mol. Biol., 16, 118, 1966), JM105(Gene, 38, 275, 1985) o similares.

Los métodos para seleccionar los clones de ADNc codificantes de VH y VL de un anticuerpo animal no humano a partir de la biblioteca de ADNc pueden incluir la hibridación de colonias o la hibridación de placas (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989) utilizando una sonda marcada con isótopos o fluorescencia.

Asimismo resulta posible preparar los ADNc codificantes de VH y VL mediante la preparación de cebadores y llevar a cabo PCR (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab. Press New York, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, suplemento 1-34) utilizando el ADNc o biblioteca de ADNc como molde.

Las secuencias de nucleótidos de los ADNc seleccionados mediante los métodos anteriormente indicados pueden determinarse mediante el corte de los ADNc con enzimas de restricción apropiados, clonándolos en un plásmido, tal como pBluescript II SK(-) (fabricado por Stratagene) y después analizándolo mediante métodos de análisis de secuencias de nucleótidos utilizados generalmente, por ejemplo, el método de dideoxi de Sanger et al. (Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 74, 5463, 1977) o mediante la utilización de autoanalizadores de secuencias de nucleótidos, por ejemplo, el secuenciador de ADN ABI PRISM 377 (fabricado por Applied Biosystems).

La longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL se deduce a partir de las secuencias de nucleótidos determinadas y se compara con la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL de un anticuerpo conocido (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991), de manera que puede confirmarse si los ADNc obtenidos codifican secuencias de aminoácidos que incluyen por completo VH y VL del anticuerpo que comprende secuencias de señal secretoria.

Además, en el caso de que la secuencia de aminoácidos de una región variable de anticuerpo o la secuencia de nucleótidos de ADN codificante de la región variable ya se conozca, puede obtenerse mediante los métodos siguientes.

En el caso de que se conozca la secuencia de aminoácidos, el ADN puede obtenerse mediante el diseño de una secuencia de nucleótidos de ADN codificante de la región variable considerando la frecuencia de uso de los codones (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991), sintetizando varios ADN sintéticos compuestos por aproximadamente 100 a 150 bases basándose en la secuencia de nucleótidos diseñada de ADN y llevando a cabo PCR utilizándolos o sintetizando la longitud completa de la secuencia de ADN. En el caso de que se conozca la secuencia de nucleótidos, puede obtenerse el ADN mediante el mismo método indicado anteriormente basándose en la información.

(3) Análisis de la secuencia de aminoácidos de la región variable de anticuerpo.

Mediante la comparación de la longitud completa de las secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo que comprende secuencias de señal secretoria con las secuencias de aminoácidos de VH y VL de un anticuerpo conocido (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991), resulta posible deducir la longitud de las secuencias de señal secretoria y las secuencias de aminoácidos N-terminales y conocer además el subgrupo al que pertenece el anticuerpo. Además, las secuencias de aminoácidos de las CDR de VH y VL pueden determinarse de una manera similar.

(4) Construcción de ADN codificante de la región variable de anticuerpo humanizado.

Pueden construirse ADNc codificantes de VH y VL del anticuerpo humanizado de la manera siguiente. En primer lugar, se seleccionan las secuencias de aminoácidos de las regiones de marco (en adelante denominadas FR) de VH y VL del anticuerpo humano para el injerto de las CDR de VH y VL del anticuerpo animal no humano deseado. Las secuencias de aminoácidos de las FR de VH y VL del anticuerpo humano pueden ser cualquiera de las de los anticuerpos humanos.

Entre los ejemplos de las mismas pueden incluirse las secuencias de aminoácidos de las FR de las VH y VL de los anticuerpos humanos registrados en bases de datos tales como Protein Data Bank, las secuencias de aminoácidos comunes a los subgrupos de FR de las VH y VL de los anticuerpos humanos (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) o similares.

Para preparar el anticuerpo humanizado con una actividad suficiente, resulta preferente seleccionar las secuencias de aminoácidos que presentan una homología tan alta como resulte posible (por lo menos 60% o superior) respecto a las secuencias de aminoácidos de las FR de VH y VL del anticuerpo animal no humano deseado.

A continuación, las secuencias de aminoácidos de las CDR de VH y VL del anticuerpo animal no humano deseado se injertan en las secuencias de aminoácidos seleccionadas de las FR de VH y VL del anticuerpo humano para diseñar secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo humanizado. Las secuencias de aminoácidos diseñadas se convierten en secuencias de nucleótidos de ADN considerando el uso de los codones en las secuencias de nucleótidos de los genes de anticuerpo (Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) y se diseñan secuencias de nucleótidos de ADN codificantes de las secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo humanizado. Las secuencias de ADN diseñadas se sintetizan por completo.

La clonación en el vector de expresión para la composición de proteína heterodímera de la presente invención construida en 3(1), anteriormente, puede llevarse a cabo fácilmente mediante la introducción de secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción apropiados en los extremos 5' de los ADN sintéticos presentes en ambos extremos. Tras la PCR, los productos de amplificación se clonan en un plásmido, tal como pBluescript II SK(-) (fabricado por Stratagene) y se determinan las secuencias de nucleótidos mediante el método indicado en 3(2), anteriormente, a fin de obtener un plásmido que presente las secuencias de nucleótidos de ADN que codifican las secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo humanizado deseado.

(5) Modificación de la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo humanizado.

Es conocido que un anticuerpo humanizado preparado meramente mediante injerto de solo CDR de VH y VL de un anticuerpo animal no humano en las FR de VH y VL de un anticuerpo humano presenta una actividad de unión a antígeno reducida en comparación con el anticuerpo animal no humano original (BIO/TECHNOLOGY 9, 266, 1991).

Lo anterior probablemente se debe a que, en VH y VL del anticuerpo animal no humano original, no sólo las CDR sino asimismo algunos de los residuos de aminoácido en las FR participan directa o indirectamente en la actividad de unión a antígeno, y dichos residuos de aminoácido resultan cambiados por residuos de aminoácido diferentes de las FR de VH y VL del anticuerpo humano mediante el injerto de CDR.

Con el fin de resolver este problema, se han realizado intentos con un anticuerpo humanizado para elevar la actividad disminuida de unión a antígeno, mediante la identificación de los residuos de aminoácido en las secuencias de aminoácidos de las FR de VH y VL del anticuerpo humano que se relacionan directamente con la unión a un antígeno o que se relacionan indirectamente con el mismo mediante la interacción con residuos de aminoácido de las CDR o el mantenimiento de la conformación del anticuerpo, y la modificación de tales residuos de aminoácido por los derivados del anticuerpo animal no humano original (BIO/TECHNOLOGY, 9, 266, 1991).

En la preparación del anticuerpo humanizado, resulta muy importante identificar eficientemente los residuos de aminoácido de FR que se relacionan con la actividad de unión a antígeno. Las conformaciones de los anticuerpos se han generado y analizado mediante cristalografía de rayos X (J. Mol. Biol., 112, 535, 1977), el modelado informático (Protein Engineering, 7, 1501, 1994) o similares.

Dicha información de las conformaciones de los anticuerpos ha proporcionado mucha información útil para la preparación de anticuerpos humanizados. Sin embargo, no existe ningún método establecido para preparar un anticuerpo humanizado que sea adaptable a cualquier tipo de anticuerpo. Actualmente todavía resultan necesarios enfoques de prueba y error, por ejemplo, la preparación de varias variantes para cada anticuerpo y el examen de la correlación con la actividad de unión a antígeno de las variantes de anticuerpo.

La modificación de los residuos de aminoácido en las FR de VH y VL de un anticuerpo humano puede conseguirse mediante PCR, tal como se ha indicado en 3(4), anteriormente, utilizando ADN sintéticos para la modificación. La secuencia de nucleótidos del producto de amplificación de PCR se determina mediante el método indicado en 3(2), anteriormente, a fin de conformar que se conseguido la modificación deseada.

(6) Expresión de la proteína heterodímera.

Los transformantes capaces de producir transitoria o establemente la proteína heterodímera pueden obtenerse mediante la introducción de los vectores de expresión de la proteína heterodímera de 3(1), anteriormente, en células animales apropiadas.

La proteína heterodímera de la presente invención es una proteína según se reivindica compuesta por primer polipéptido que comprende CH y segundo polipéptido que comprende CL-Fc, en el que los residuos de Cys que participan en enlaces disulfuro entre CL y CH1 están eliminados o sustituidos, y la cantidad de multímeros de la proteína heterodímera resulta notablemente reducida en las células hospedadoras en las que se ha introducido el vector de expresión. Por lo tanto, la proteína heterodímera de la presente invención es una molécula según se reivindica que puede formar eficientemente una estructura heterodimérica compuesta por primer polipéptido que comprende CH y segundo polipéptido que comprende CL-Fc.

Además, la presente divulgación incluye un método para reducir los multímeros de proteína heterodímera mediante la eliminación o la sustitución de los residuos de Cys que participan en enlaces disulfuro entre CL y CH1 en la proteína heterodímera compuesta por primer polipéptido que comprende CH y segundo polipéptido que comprende CL-Fc.

(6-a) Expresión transitoria de la proteína heterodímera.

Los vectores de expresión de proteína heterodímera obtenidos en (3) y (6) o los vectores de expresión obtenidos mediante la modificación de dichos vectores se utilizan para la expresión transitoria de la proteína heterodímera. De esta manera, resulta posible evaluar eficientemente la actividad de unión a antígeno de los diversos tipos de proteínas heterodímeras preparadas.

Puede utilizarse cualquier tipo de células como la célula hospedadora en la que se introduce el vector de expresión, con la condición de que sea una célula hospedadora que puede expresar la proteína heterodímera y puede utilizarse, por ejemplo, la célula COS-7 [American Type Culture Collection (ATCC) nº CRL1651] (Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, 283, 1991).

Para introducir un vector de expresión células COS-7, se utiliza un método de DEAE-dextrano (Methods in Nucleic Acids Res., CRC Press, 1991), un método de lipofección [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413, 1987], o similar.

Tras la introducción del vector de expresión, se mide la cantidad de expresión y la actividad de unión a antígeno de la proteína heterodímera en el sobrenadante de cultivo, mediante ELISA (Monoclonal Antibodies-Principles and practice, tercera edición, Academic Press, 1996, Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, Manual for Monoclonal Antibody Experiment, Kodansha Scientific Ltd., 1987, o similar).

(6-b) Expresión estable de la proteína heterodímera.

Pueden obtenerse transformantes capaces de expresar establemente la proteína heterodímera mediante la introducción de los vectores de expresión de la proteína heterodímera en (1), en células hospedadoras apropiadas.

Puede utilizarse cualquier método como el método de introducción del vector de expresión en la célula hospedadora, con la condición de que sea el método de introducción de un ADN en las células hospedadoras. Entre los ejemplos del mismo pueden incluirse la electroporación (Cytotechnology, 3, 133, 1990), un método de fosfato cálcico (publicación de patente japonesa nº H2-227075), Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413, 1987; un método de inyección [Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual]; un método que utiliza una pistola de partículas (pistola génica) (patentes japonesa nº 2606856 y nº 2517813), un método de DEAE-dextrano [Biomanual Series 4-Methods of Gene Transfer, Expression and Analysis (Yodosha), editado por Takashi Yokota y Kenichi Arai, 1994] y un método de vector vírico (Manipulating Mouse Embryo, segunda edición) o similar.

Las células hospedadoras en las que se ha introducido el vector de expresión de proteína heterodímera pueden ser cualesquiera células, con la condición de que sean capaces de expresar la proteína heterodímera. Pueden utilizarse células Namalwa de leucemia humana, células COS, células de hámster chino CHO, HBT5637 (publicación de patente japonesa nº S63-299), células de mieloma de rata, células de mieloma de ratón, células derivadas de riñón de hámster sirio, células madre embrionarias, células de huevo fertilizado, o similares.

Entre los ejemplos específicos de las mismas pueden incluirse PER.C6, CHO-K1 (ATCC nº CCL-61), DUKXB11 (ATCC nº CCL-9096), Pro-5 (ATCC nº CCL-1781), CHO-S (Life Technologies, nº de cat. 11619), células Lec13, células de mieloma de rata YB2/3HL.P2.G11.16Ag. 20 (ATCC nº CRL1662, asimismo denominadas YB2/0), células de mieloma de ratón NS0, células de mieloma de ratón SP2/0-Ag14 (ATCC nº CRL1581), células P3X63-Ag8.653 de ratón (ATCC nº CRL1580), células CHO deficientes en gen de dihidrofolato reductasa (en adelante denominado dhfr) (CHO/DG44) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216, 1980], células de hámster chino BHK, células HBT563, subcepas de las estirpes celulares anteriormente indicadas y células preparadas mediante la adaptación de las estirpes celulares anteriormente indicadas, en medio libre de suero o bajo condiciones de cultivo no adherente, o similares.

En la presente invención, como célula utilizada para la producción de la proteína heterodímera, puede utilizarse una célula reductora o que elimina la cantidad de fucosa nuclear de la cadena de azúcar unida por Asn en la posición 297 según índice EU en la región Fc. Específicamente, como células hospedadoras pueden utilizarse células seleccionadas en las que el enzima referente a la síntesis de la GDP-L-fucosa, un enzima relacionado con el transporte de la GDP-L-glucosa hasta el cuerpo de Golgi, o un enzima relacionado con la unión de una fucosa nuclear, está reducido o eliminado, o células obtenidas mediante diversos métodos artificiales.

Específicamente, puede prepararse una célula en la que se controla la fucosa nuclear mediante un método para reducir o eliminar una actividad enzimática relacionada con la modificación de la cadena de azúcar de una fucosa nuclear, un método para incrementar la actividad de un enzima de corte de fucosa nuclear, o similar.

Entre los ejemplos del enzima relacionado con la modificación de la cadena de azúcar de una fucosa nuclear puede incluirse un enzima relacionado con la síntesis o transporte de GDP-L-fucosa, y un enzima relacionado con la unión de una fucosa nuclear a una cadena de azúcar unida a N-glucósido de tipo complejo.

Entre los ejemplos específicos del enzima relacionado con la síntesis de GDP-L-fucosa o el transporte al cuerpo de Golgi puede incluirse la GDP-manosa 4,6-deshidratasa (en adelante denominada GMD), la GDP-4-ceto-6-desoxi-D-manosa-3,5-epimerasa (en adelante denominada Fx), la GDP-beta-L-fucosa pirofosforilasa (GFPP), la fucocinasa, el transportador de GDP-L-fucosa o similar.

Entre los ejemplos de enzimas relacionados con la unión de fucosa nuclear pueden incluirse α 1,6-fucosiltransferasa (en adelante denominada FUT8) o similar.

La célula para producir la proteína heterodímera de la presente invención puede incluir una célula en la que se ha reducido o eliminado una de las actividades enzimáticas anteriormente indicadas o una célula en la que se ha reducido o eliminado una pluralidad de actividades enzimáticas.

El método para reducir o eliminar la actividad enzimática anteriormente indicada puede incluir:

- (a) una técnica de disrupción génica con diana en un gen del enzima,
- (b) una técnica de introducción de un mutante dominante-negativo del gen del enzima,
- (c) una técnica de introducción de una mutación en el enzima,
- (d) una técnica de supresión de la transcripción o traducción del gen del enzima,
- (e) una técnica de elección de una estirpe celular resistente a una lectina que reconoce una estructura de cadena de azúcar en la que la posición 1 de la fucosa está unida a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el extremo reductor de una cadena de azúcar unida a N-glucósido mediante enlace α , o similar.

La lectina puede incluir la unión a lectina a α 1,6-fucosa, tal como lectina de lenteja LCA (aglutinina de lenteja derivada de *Lens culinaris*), lectina pSA de guisante (lectina de guisante derivada de *Pisum sativum*), lectina VFA de haba (aglutinina derivada de *Vicia faba*), lectina AAL de *Aleuria aurantia* (lectina derivada de *Aleuria aurantia*), o similar.

Entre los ejemplos específicos de la célula pueden incluirse la célula CHO deficiente en gen de FUT8 (documentos nº WO 2005/035586, nº WO 2002/31140 y nº WO 2000/061739), Lec13 de resistencia adquirida a lectina (Somatic Cell and Molecular genetics, 12, 55, 1986), célula deficiente en gen del transportador de GDP-fucosa (nº WO 2003/085102), célula deficiente en gen de GDP-manosa 4,6-deshidratasa (GMD) (documento nºWO 2002/31140), célula resistente a lectina WGA, célula resistencia a lectina LCA (documento nºWO 2002/31140) o similar.

Además del método anteriormente indicado, la composición de proteína heterodímera en la que se une una cadena de azúcar unida a N de tipo rico en manosa y la cantidad de fucosa nuclear está reducida puede expresarse mediante la inhibición de un enzima relacionado con el sistema de síntesis de cadena de azúcar unida a N, tal como la manosidasa I, la manosidasa II o similar.

Además, mediante la utilización de una célula hospedadora que sobreexpresa la N-acetilglucosamina transferasa III (GnTIII), puede producirse la composición de proteína heterodímera a la que se une un complejo de unión a GICNAc bisectada y cadenas de azúcar híbridas, y en la que la cantidad de fucosa nuclear está reducida.

Tras la introducción del vector de expresión, se seleccionan los transformantes que expresan establemente la proteína heterodímera, mediante el cultivo de los mismos en un medio para el cultivo de células animales que contiene un agente tal como sulfato de G418 (en adelante denominado G418), cicloheximida (en adelante abreviado CHX), metotrexato (en adelante abreviado MTX) o similar (publicación de patente japonesa nº H2-257891).

El medio para el cultivo de células animales puede incluir medio RPMI1640 (fabricado por Invitrogen), medio GIT (fabricado por NIHON PHARMACEUTICAL CO.), medio EX-CELL301, medio EX-CELL302, medio EX-CELL325 (fabricado por JRH), medio IMDM (fabricado por Invitrogen), medio SFM de hibridoma (fabricado por Invitrogen), medios obtenidos mediante la adición de diversos aditivos, tales como suero de feto bovino (en adelante abreviado FBS) a dichos medios, o similares.

La proteína heterodímera puede expresarse y acumularse en un sobrenadante de cultivo mediante el cultivo de los transformantes obtenidos en un medio. La cantidad de expresión y la actividad de unión a antígeno de la proteína heterodímera en el sobrenadante de cultivo pueden medirse mediante ELISA, o similar. Además, la

cantidad de expresión de proteína heterodímera producida por el transformante puede incrementarse mediante la utilización de un sistema de amplificación de gen dhfr o similar (publicación de patente japonesa nº H2-257891).

El método para expresar la composición de proteína heterodímera utilizando una célula animal como el huésped ha sido descrito, aunque la composición de proteína heterodímera asimismo puede producirse en levadura, en una célula de insecto, en una célula vegetal, en un individuo animal o en una planta individual, de la misma manera que en células animales, basándose en tecnología conocida.

En el caso de que se utilice levadura como la célula hospedadora, se proporciona a título de ejemplo un microorganismo perteneciente a *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Trichosporon*, *Schwanniomyces* o similar, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Trichosporon pullulans*, *Schwanniomyces alluvius* o similar

La introducción del vector recombinante puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los métodos de introducción de ADN en levaduras, por ejemplo, la electroporación (Methods Enzymol., 194, 182, 1990), el método de esferoplastos (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929, 1978), el método de acetato de litio (J. Bacteriology, 153, 163, 1983), el método indicado en Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929, 1978], o similar.

En el caso de que se utilice una célula de insecto como la célula hospedadora, la proteína heterodímera puede expresarse mediante, por ejemplo, los métodos indicados en Current Protocols in Molecular Biology; Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, New York, 1992; Bio/Technology, 6, 47, 1988 o similares.

Por lo tanto, en el caso de que la célula hospedadora posea la capacidad de expresar la molécula de proteína heterodímera, la composición de proteína heterodímera de la presente invención puede producirse mediante la introducción del gen de la proteína heterodímera en las células hospedadoras indicadas anteriormente, y el cultivo de las células seguido de la purificación de la composición de proteína heterodímera deseada a partir del cultivo.

Además, la composición de proteína heterodímera puede producirse utilizando un individuo animal en el que se introduce un gen (animal transgénico no humano) o una planta individual en la que se introduce un gen (planta transgénica), que se construye mediante rediferenciación de las células animales o vegetales en las que se introducen los genes.

En el caso de que el transformante sea un animal individual o una planta individual, la composición de proteína heterodímera puede producirse mediante cría o cultivo de una manera habitual, permitiendo que se forme y se acumule en el mismo la composición de proteína heterodímera, y recolección de la composición de proteína heterodímera a partir del animal individual o planta individual.

Entre los ejemplos del método de producción de la composición de proteína heterodímera que utiliza un animal individual pueden incluirse un método de producción de la composición de proteína heterodímera deseada en un animal construido mediante la introducción del gen según métodos conocidos [American Journal of Clinical Nutrition, 63, 639S, 1996; American Journal of Clinical Nutrition, 63, 627S, 1996; Bio/Technology, 9, 830, 1991].

En el caso de un individuo animal, la composición de proteína heterodímera puede producirse mediante, por ejemplo, cría de un animal transgénico no humano en el que se introduce ADN codificante de la molécula de proteína heterodímera, permitiendo que se forme y acumule la composición de proteína heterodímera en el animal y recolectando la composición de proteína heterodímera a partir del mismo.

Entre los sitios para la formación y acumulación en el animal pueden incluirse, por ejemplo, la leche (publicación de patente japonesa nº S63-309192), huevos o similares del animal. Como promotor en dicho procedimiento, puede utilizarse cualesquiera promotores capaces de expresarlo en un animal. Por ejemplo, preferentemente se utilizan promotores específicos de células de glándula mamaria, tales como promotor de caseína α , promotor de caseína β , promotor de lactoglobulina β , promotor de proteína ácida del suero o similares.

Entre los ejemplos del método de producción de la composición de proteína heterodímera utilizando una planta individual pueden incluirse un método e cultivo de una planta transgénica en la que se introduce ADN codificante de la molécula de proteína heterodímera según métodos conocidos [Tissue Culture, 20 (1994); Tissue Culture, 21 (1995); Trends in Biotechnology, 15, 45 (1997)], permitiendo que se forme y acumule la composición de proteína heterodímera en la planta, y recolectando la composición de proteína heterodímera a partir de la planta.

(7) Purificación de la proteína heterodímera.

Al cultivar las células hospedadoras en las que se ha introducido el vector de expresión de proteína heterodímera, se producen proteínas homodiméricas, compuestas por los dos segundos polipéptidos, y proteínas heterodímeras, compuestas por el primer polipéptido y el segundo polipéptido. La proteína heterodímera de la presente invención es una proteína según se reivindica, compuesta por el primer polipéptido que comprende CH y el segundo

polipéptido, que comprende CL-Fc, en el que el segundo polipéptido es además un polipéptido que presenta una actividad de unión reducida o nula al ligante de CH, y por lo tanto, la proteína heterodímera que incluye el primer polipéptido de unión al ligante de CH sólo puede separarse y purificarse específicamente.

5 Por lo tanto, el método de purificación utilizado en la presente invención incluye un procedimiento de unión de la proteína heterodímera al ligante de CH y un procedimiento de elución de la proteína heterodímera. Es decir, el método de purificación de la proteína heterodímera de la presente invención puede ser un método de purificación que comprende los procedimientos (i) a (iii) a continuación.

10 (i) Un procedimiento de reducción o eliminación de la actividad de unión del segundo polipéptido al ligante de CH en la proteína heterodímera compuesta por el primer polipéptido que comprende CH y el segundo polipéptido que comprende CL-Fc.

15 (ii) Un procedimiento de unión de la proteína heterodímera al ligante de CH.

(iii) Un procedimiento de elución de la proteína heterodímera.

Más específicamente, por ejemplo, en el procedimiento de preparación de las células de producción de la proteína heterodímera de (i), indicada anteriormente, puede llevarse a cabo apropiadamente según la subclase de región constante de anticuerpo incluida en la proteína heterodímera, un procedimiento de adición al segundo polipéptido de cualquier sustitución seleccionada de C214S, C220S, H435R y Y436F, según el índice EU.

20 Entre los ejemplos específicos de los mismos puede incluirse un procedimiento de adición de las sustituciones C214S y H435R según el índice EU, las sustituciones C220S y H435R según el índice EU, o las sustituciones C214S, H435R y Y436F según el índice EU, al segundo polipéptido, o similar.

Además, el método de purificación de la proteína heterodímera de la presente invención puede ser un método de purificación que comprende los procedimientos (i) a (iv) a continuación.

30 (i) Un procedimiento de reducción o eliminación de la actividad de unión del segundo polipéptido al ligante de CH en la proteína heterodímera compuesta por el primer polipéptido que comprende CH y el segundo polipéptido que comprende CL-Fc.

35 (ii) Un procedimiento de eliminación o sustitución de residuos Cys que participan en enlaces disulfuro entre CH y CL de la proteína heterodímera.

(iii) Un procedimiento de unión de la proteína heterodímera al ligante de CH.

(iv) Un procedimiento de elución de la proteína heterodímera.

40 En la presente invención, la formación de halfmeros y/o multímeros de la proteína heterodímera de la presente invención puede reducirse mediante eliminación o sustitución de residuos Cys que participan en enlaces disulfuro entre CH y CL durante el procedimiento de producción anteriormente indicado (i).

45 El método para reducir la formación de halfmeros de la proteína heterodímera de la presente invención puede ser un método para reducir la formación de halfmeros de la proteína heterodímera que comprende los procedimientos (i) a (iii), a continuación.

50 (i) Un procedimiento de introducción de una sustitución R409K según el índice EU en la proteína heterodímera compuesta por el primer polipéptido que comprende CH y el segundo polipéptido que comprende FL.

(ii) Un procedimiento de unión de la proteína heterodímera al ligante de CH.

(iii) Un procedimiento de purificación de la proteína heterodímera.

55 La presente divulgación puede incluir un método para reducir la formación de multímeros de la proteína heterodímera, que comprende los procedimientos (i) a (iii), a continuación.

60 (i) Un procedimiento de eliminación o sustitución de residuos Cys que participan en enlaces disulfuro entre CH y CL en la proteína heterodímera compuesta por el primer polipéptido que comprende CH y el segundo polipéptido que comprende FL.

(ii) Un procedimiento de unión de la proteína heterodímera al ligante de CH.

65 (iii) Un procedimiento de purificación de la proteína heterodímera.

El método para reducir la formación de halfmeros y multímeros de la proteína heterodímera de la presente invención puede ser un método para reducir la formación de halfmeros de la proteína heterodímera que comprende los procedimientos (i) a (iv), a continuación.

- 5 (i) Un procedimiento de eliminación o sustitución de residuos Cys que participan en enlaces disulfuro entre CH y CL en la proteína heterodímera compuesta por el primer polipéptido que comprende CH y el segundo polipéptido que comprende FL.
- (ii) Un procedimiento de introducción de una sustitución R409K según el índice EU.
- 10 (iii) Un procedimiento de unión de la proteína heterodímera al ligante de CH.
- (iv) Un procedimiento de purificación de la proteína heterodímera.

15 Más específicamente, por ejemplo, en el procedimiento de preparación de las células de producción de la proteína heterodímera de (i) o (ii), indicado anteriormente, puede llevarse a cabo apropiadamente según la subclase de región constante de anticuerpo incluida en la proteína heterodímera, un procedimiento de adición al segundo polipéptido de una sustitución cualquiera seleccionada de las sustituciones C214S, C220S, R409K y H435R, según el índice EU.

20 Más específicamente puede llevarse a cabo, por ejemplo, un procedimiento de adición de las sustituciones C214S, R409K y H435R según el índice EU, de las sustituciones C220S, R409K y H435R según el índice EU, o de las sustituciones C214S, R409K, H435R y Y436F según el índice EU, al segundo polipéptido.

25 La proteína heterodímera de la presente invención puede purificarse de la manera siguiente. La composición de proteína heterodímera que se prepara mediante el transformante en el que se ha introducido el gen codificante de la molécula de proteína heterodímera puede obtenerse de la manera siguiente. Por ejemplo, al expresar la composición de proteína heterodímera en forma de una proteína soluble dentro de las células, se recuperan las células mediante centrifugación tras completarse el cultivo, se suspenden en un tampón acuoso y después se rompe utilizando un ultrasonificador, una prensa francesa, un homogeneizador Manton-Gaulin, un molino Dyno-Mill o similar, a fin de obtener un extracto sin células.

35 A partir del sobrenadante que se obtiene mediante centrifugación del extracto sin células, puede obtenerse un producto purificado de la composición de proteína heterodímera mediante técnicas generales de aislamiento y purificación enzimática, tales como la extracción con solvente, la precipitación salina utilizando sulfato amónico o similar, la desalación, la precipitación utilizando un solvente orgánico, la cromatografía de intercambio aniónico utilizando una resina, tal como detilaminoetil (DEAE)-sefarosa o DIAION HPA-75 (fabricado por Mitsubishi Chemical Corporation), cromatografía de intercambio catiónico utilizando una resina, tal como S-sefarosa FF (fabricada por Pharmacia), cromatografía hidrofóbica utilizando una resina, tal como butil-sefarosa o fenil-sefarosa, filtración en gel utilizando un tamiz molecular, cromatografía de afinidad, cromatografía de electroforesis, tal como electroforesis de enfoque isoeléctrico, o similar, que pueden utilizarse solos o utilizarse en combinación.

40 En la presente invención, como la cromatografía de afinidad, se utiliza cromatografía de afinidad que utiliza un ligante de CH (Monoclonal Antibodies-Principles and practice, tercera edición, Academic Press 1996; Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

45 Además, en el caso de que la composición de proteína heterodímera se exprese dentro de las células mediante la formación de un cuerpo de inclusión, se recuperan las células, se rompen y se centrifugan de la misma manera, y se recupera el cuerpo de inclusión de la composición de proteína heterodímera en forma de una fracción precipitada. El cuerpo de inclusión recuperado de la composición de proteína heterodímera se solubiliza con un agente desnaturante de proteínas. La composición de proteína heterodímera se prepara en una conformación normal mediante dilución o diálisis de la solución solubilizada, y después se obtiene un producto purificado de la composición de proteína heterodímera mediante el método de aislamiento y purificación indicado anteriormente.

50 Al secretar extracelularmente la composición de proteína heterodímera, la composición de proteína heterodímera o derivado de la misma puede recuperarse a partir del sobrenadante de cultivo. Es decir, el cultivo se trata mediante un método, tal como la centrifugación, de la manera indicada anteriormente, a fin de obtener un sobrenadante de cultivo, puede obtenerse un producto purificado de la composición de proteína heterodímera a partir del sobrenadante de cultivo mediante el método de aislamiento y purificación indicado anteriormente.

60 Específicamente, el ligante de CH o ligante de Fc puede ser cualquiera con la condición de que se una a CH o Fc, tal como proteínas, resinas o similares, y entre los ejemplos del mismo pueden incluirse proteínas de unión a Fc, anticuerpos que se unen a la región constante de la cadena H (CH) de un anticuerpo o similar.

65 Entre los ejemplos específicos de la proteína de unión a Fc puede incluirse proteína A derivada de *Staphylococcus aureus*, proteína G hemolítica derivada de *Streptococcus*, receptor de Fc, subclases (FcγRI, IIA, IIB, IIIA, IIIB),

fragmentos de unión de los mismos, o similares.

Entre los ejemplos del anticuerpo de unión a CH pueden incluirse anticuerpos de unión al dominio CH1, al dominio bisagra, al dominio CH2 o al dominio CH3.

En la presente invención, el ligante de CH puede incluir más preferentemente proteína A, proteína G, anticuerpo anti-CH1 y fragmento de unión de los mismos.

Como método de purificación de la proteína heterodímera de la presente invención, por ejemplo, el sobrenadante obtenido mediante cultivo de la estirpe celular transformada preparada en 3(6) se carga en una columna de proteína A o columna de proteína G, y después se lava esta columna con solución salina tamponada con fosfato (en adelante abreviadamente 'PBS').

Después, la proteína heterodímera se eluye de la columna utilizando un tampón de citrato de pH bajo (pH 2.0 a 6.0) o similar; se neutralizó el eluido con tampón Tris alcalino o similar. El eluido neutralizado se sometió a diálisis utilizando una cantidad suficiente de PBS o similar, con el fin de obtener la proteína heterodímera purificada.

El peso molecular de la molécula de proteína heterodímera purificada puede medirse mediante electroforesis en gel de poliacrilamida [Nature, 227, 680, 1970], transferencia Western [Monoclonal Antibodies - Principles and practice, tercera edición, Academic Press, 1996, Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988] o similares.

4. Evaluación de la actividad de la composición de proteína heterodímera.

La cantidad de proteína, actividad de unión de FcR, actividad de unión de C1q, actividad de unión a antígeno o actividad citotóxica, tal como actividad de ADCC y actividad de CDC de la composición de proteína heterodímera purificada puede medirse utilizando métodos conocidos, por ejemplo los indicados en Molecular Cloning 2nd Edition, Current Protocols in Molecular Biology, Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, Monoclonal Antibodies: principles and practice, tercera edición, Acad. Press, 1993, Antibody Engineering, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1996, o similares.

Específicamente, la actividad de unión de la composición de proteína heterodímera a un antígeno o a una estirpe celular en cultivo positiva para antígeno puede medirse mediante ELISA, la técnica de anticuerpos fluorescentes (Cancer Immunol. Immunother. 36, 373, 1993) o similar. La actividad citotóxica contra la estirpe celular en cultivo que es positiva para antígeno puede evaluarse mediante la medición de la actividad de CDC, la actividad de ADCC o similar [Cancer Immunol. Immunother, 36, 373, 1993; solicitud publicada de patente US nº 2004/0259150].

La actividad de unión de FcR de la composición de proteína heterodímera de la presente invención puede confirmarse mediante la producción de una proteína FcγRIIIA recombinante o un receptor de Fc neonatal recombinante (FcRn), midiendo después la actividad de unión (solicitud publicada de patente US nº 2004/0259150).

Entre los ejemplos del método para medir la actividad de ADCC puede incluirse un método en el que la célula diana marcada con un isótopo radioactivo, una sustancia fluorescente, un pigmento o similar, se deja que entre en contacto con la proteína heterodímera y una célula efectora, y después se mide la actividad de la sustancia marcada que se libera a partir de la célula diana lesionada o se mide la actividad biológica del enzima liberado a partir de la misma.

Entre los ejemplos del método para medir la actividad de CDC puede incluirse un método en el que la célula diana marcada con un isótopo radioactivo, una sustancia fluorescente, un pigmento o similar, se deja que entre en contacto con la proteína heterodímera y una muestra biológica, tal como suero que contiene un componente del complemento, y después se mide la actividad de la sustancia marcada que se libera a partir de la célula diana lesionada o se mide la actividad biológica del enzima liberado a partir de la misma.

5. Análisis de cadenas de azúcar de la composición de proteína heterodímera

La estructura de cadena de azúcar de la molécula de proteína heterodímera expresada en diversas células puede analizarse según métodos generales de análisis de la estructura de cadena de azúcar de la glucoproteína. Por ejemplo, una cadena de azúcar unida a una molécula de IgG consiste en azúcares neutros, tales como galactosa (Gal), manosa (Man) o fucosa (Fuc), aminoazúcares tales como N-acetilglucosamina (GlcNAc) y azúcares ácidos, tales como ácido siálico (Sial), y puede analizarse mediante técnicas tales como el análisis de la estructura de cadenas de azúcar utilizando el análisis de composición de azúcares y el mapeado bidimensional de cadenas de azúcar.

(1) Análisis de las composiciones de azúcares neutros y aminoazúcares.

La composición de cadenas de azúcar de la composición de proteína heterodímera puede analizarse llevando a

cabo la hidrólisis ácida de las cadenas de azúcar con ácido trifluoroacético o similar a fin de liberar azúcares neutros o aminoazúcares y mediante el análisis de la proporción composicional.

Específicamente, el análisis puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, un método que utiliza un dispositivo de análisis de la composición de azúcares fabricado por Dionex. BioLC es un dispositivo para el análisis de la composición de azúcares mediante HPAEC-PAD (cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento-detección amperométrica pulsada) (J. Liq. Chromatogr., 6, 1577, 1983).

Además, la proporción composicional asimismo puede analizarse mediante el método de marcaje fluorescente utilizando 2-aminopiridina. Específicamente, la proporción composicional puede calcularse mediante marcaje fluorescente de una muestra sometida a hidrólisis ácida mediante 2-aminopiridilación según un método conocido [Agric. Biol. Chem. 55(1):283-284, 1991]] y después analizando la composición mediante HPLC.

(2) Análisis de las estructuras de las cadenas de azúcar.

Las estructuras de las cadenas de azúcar de la composición de proteína heterodímera puede analizarse mediante mapeado bidimensional de cadenas de azúcar [Anal.Biochem.,171,73,1988, Biochemical Experimentation Methods 23- Methods of Studies on Glycoprotein Sugar Chains (Japan Scientific Societies Press) Reiko Takahashi (1989)]. El mapeado bidimensional de cadenas de azúcar es un método de deducción de la estructura de las cadenas de azúcar, por ejemplo mediante la representación gráfica del tiempo de retención o la posición de elución de una cadena de azúcar en la cromatografía de fase inversa como eje X y el tiempo de retención o posición de elución de la cadena de azúcar mediante cromatografía en fase normal como eje Y, respectivamente, comparándolas con los resultados de cadenas de azúcar conocidas.

Específicamente, se libera una cadena de azúcar a partir de la proteína heterodímera mediante hidrazinolisis de la proteína heterodímera y se somete a marcaje fluorescente con 2-aminopiridina (en adelante abreviado a 'PA') (J. Biochem. 95, 197, 1984). Tras la separación respecto de un reactivo de tratamiento con PA adicional mediante filtración en gel, la cadena de azúcar se somete a cromatografía de fase inversa. A continuación, cada pico de la cadena de azúcar fraccionada se somete a cromatografía de fase normal. La estructura de la cadena de azúcar puede deducirse mediante la representación gráfica de los resultados obtenidos en un mapa bidimensional de la cadena de azúcar y comparándola con los puntos de un estándar de cadena de azúcar (fabricado por TaKaRa) o los indicados en el documento (Anal. Biochem. 171, 73, 1988).

Además, la estructura deducida mediante el mapeado bidimensional de cadenas de azúcar puede confirmarse llevando a cabo espectrometría de masas, por ejemplo, MALDI-TOF-MS, de cada cadena de azúcar.

La parte a la que se une una cadena de azúcar en la región Fc de la proteína heterodímera puede confirmarse mediante tratamiento de la proteína heterodímera que se somete a alquilación reductora con una endoproteasa, tal como tripsina, pepsina, Lys-C o Asp-N, y separándola mediante cromatografía de fase inversa (CL), para analizarla utilizando un espectrómetro de masas (MS).

Es decir, puede confirmarse si una cadena de azúcar está de hecho unida o no mediante la comprobación de si los pesos moleculares de los péptidos obtenibles mediante tratamiento con proteasa y el peso molecular del péptido al que se encuentra unido la cadena de azúcar corresponden a los valores del análisis de MS basándose en la secuencia de aminoácidos de la región Fc objetivo de la proteína heterodímera.

6. Método para determinar la estructura de cadena de azúcar de la molécula de proteína heterodímera.

La composición de proteína heterodímera está compuesta por moléculas de proteína heterodímera que presentan diferentes estructuras de cadena de azúcar unidas a Asn en la posición 297 en la región Fc de la proteína heterodímera. La composición de proteína heterodímera en la que la proporción de cadenas de azúcar sin fucosa nuclear de entre el total de cadenas de azúcar unidas a N-glucósido de tipo complejo que se unen a Fc de la composición de proteína heterodímera de la presente invención es de 20% o superior, muestra una elevada actividad de ADCC. Dicha composición de proteína heterodímera puede determinarse utilizando el método de análisis de la estructura de cadenas de azúcar de la molécula de proteína heterodímera indicada en 5, anteriormente. Además, asimismo puede determinarse mediante un método cuantitativo inmunológico utilizando lectinas.

La determinación de la estructura de cadena de azúcar de la molécula de proteína heterodímera mediante un método cuantitativo inmunológico utilizando lectinas puede llevarse a cabo según un método cuantitativo inmunológico tal como la tinción western, el RIA (radioinmunoensayo), VIA (viroinmunoensayo), EIA (enzimo-inmunoensayo), FIA (fluoroimunoensayo) y MIA (metaloimunoensayo) descritos en el documento [Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Wiley-Liss, Inc., 1995; Enzyme Immunoassay, 3a ed., IGAKU-SHOIN Ltd. (1987); Enzyme Antibody Technique, edición revisada, Gakusai Kikaku, 1985], por ejemplo, de la manera siguiente.

Una lectina que reconoce la estructura de cadena de azúcar de la molécula de proteína heterodímera incluida en

la composición de proteína heterodímera se marca y la lectina marcada se somete a la reacción con la misma composición de proteína heterodímera, seguido de la medición de la cantidad de un complejo de la lectina marcada con la molécula de proteína heterodímera.

5 Entre los ejemplos de la lectina utilizada para identificar la estructura de cadena de azúcar de la molécula de proteína heterodímera puede incluirse WGA (aglutinina de germen de trigo derivada de *T. vulgaris*), ConA (concanavalina A derivada de *C. ensiformis*), RIC (toxina derivada de *R. communis*), L-PHA (leucoaglutinina derivada de *P. vulgaris*), LCA (aglutinina de lenteja derivada de *L. culinaris*), PSA (lectina de guisante derivada de *P. sativum*), AAL (lectina de *Aleuria aurantia*), ACL (lectina de *Amaranthus caudatus*), BPL (lectina de *Bauhinia purpurea*), DSL (lectina de *Datura stramonium*), DBA (aglutinina de *Dolichos biflorus*), EBL (lectina de corteza de saúco), ECL (lectina de *Erythrina cristagalli*), EEL (lectina de *Euonymus europaeus*), GNL (lectina de *Galanthus nivalis*), GSL (lectina de *Griffonia simplicifolia*), HPA (aglutinina de *Helix pomatia*), HHL (lectina de *Hippeastrum* híbrido), Jacalina, LTL (lectina de *Lotus tetragonolobus*), LEL (lectina de *Lycopersicon esculentum*), MAL (lectina de *Maackia amurensis*), MPL (lectina de *Maclura pomifera*), NPL (lectina de *Narcissus pseudonarcissus*), PNA (aglutinina de cacahuete), E-PHA (eritroaglutinina de *Phaseolus vulgaris*), PTL (lectina de *Psophocarpus tetragonolobus*), RCA (aglutinina de *Ricinus communis*), STL (lectina de *Solanum tuberosum*), SJA (aglutinina de *Sophora japonica*), SBA (aglutinina de soja), UEA (aglutinina de *Ulex europaeus*), WL (lectina de *Vicia villosa*), WFA (aglutinina de *Wisteria floribunda*).

20 Preferentemente se utiliza la lectina que reconoce específicamente la fucosa nuclear y entre los ejemplos específicos de la misma pueden incluirse la lectina de lenteja LCTA (aglutinina de lenteja derivada de *Lens culinaris*), lectina de guisante PSA (lectina de guisante derivada de *Pisum sativum*), lectina de haba VFA (aglutinina derivada de *Vicia faba*), lectina de *Aleuria aurantia* AAL (lectina derivada de *Aleuria aurantia*), o similar.

25 7. Utilización de la composición de proteína heterodímera de la presente invención.

Con respecto a la composición de proteína heterodímera de la presente invención, las proteínas heterodímeras que presentan actividad de unión monovalente a tetravalente pueden prepararse mediante la conexión de una proteína de unión específica de molécula con el extremo N y el extremo C de CH y CL-Fc (proteína de andamiaje heterodímero, HSP) que constituye la molécula de la proteína heterodímera.

Por lo tanto, la composición de proteína heterodímera de la presente invención puede utilizarse como un fármaco de proteína heterodímera debido a que puede adaptarse para presentar una forma molecular para el antígeno diana.

35 Por ejemplo, en el caso de que la proteína heterodímera de la presente invención sea un anticuerpo monovalente que presenta un dominio de unión monovalente, se une a un epítipo de la diana en una proporción 1:1 y, de esta manera, no causa enlace cruzado del antígeno y es capaz de inhibir la activación del antígeno y la actividad del antígeno.

40 Además, en el caso de que la proteína heterodímera de la presente invención sea un anticuerpo divalente (asimismo denominado anticuerpo biespecífico) que presenta una actividad de unión divalente, se une a dos epítopos, causando de esta manera el enlace cruzado de dos antígenos o se une a dos antígenos expresados sobre células diferentes, causando de esta manera el enlace cruzado célula-célula.

45 Además, en el caso de que la proteína heterodímera de la presente invención cause el enlace cruzado célula-célula, las células inmunitarias pueden acumularse en torno a las células diana y activarse mediante entrecruzamiento de un antígeno sobre la célula diana con un antígeno sobre la superficie de células tales como las células T citotóxicas (CTL), células B, linfocitos NK, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos.

50 La unión de antígeno a la proteína heterodímera de la presente invención puede ser cualquier antígeno, y preferentemente incluye moléculas de antígeno asociadas al cáncer, enfermedades inmunitarias, enfermedades alérgicas o enfermedades cardiovasculares. Entre los ejemplos de las mismas pueden incluirse citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y receptores de los mismos, antígenos CD o similares.

55 Entre los ejemplos de las citocinas o los factores de crecimiento pueden incluirse interferón (en adelante denominado INF)- α , INF- β , INF- γ , interleucina (en adelante denominada IL)-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, IL-27, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), receptores de los mismos, o similares.

60 Entre los ejemplos de las quimiocinas pueden incluirse SLC, ELC, 1-309, TARC, MDC, MIP-3 α , CTACK y receptores de dichas quimiocinas.

65 Entre los ejemplos de factores de crecimiento pueden incluirse factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), angiopoyetina, factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento

similar a insulina (IGF), eritropoyetina (EPO), TGF β , lefrina, angiopoyetina, ligando 'Frizzled', SDF-1, receptores de los mismos, o similares.

Entre los ejemplos de agregado de antígenos de diferenciación (en adelante denominado CD) pueden incluirse CD2, CD3, CD4, CD7, CD10, CD14, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD28, CD32, CD37, CD40, CD44, CD52, CD64, CD53, CD56, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80 (B7.1), CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85, CD86 (B7.2), CD98, antígeno leucocitario humano (HLA)-clase II, HLA-I, o similar.

Además, entre los ejemplos del antígeno que participa en la formación del estado patológico de tumor o los antígenos para el anticuerpo que regula la función inmunitaria pueden incluirse gangliósido GM1, GM2, GD2, GD3, Lewis X, Lewis Y, CD3, CD4, CD40, ligando de CD40, moléculas de la familia de B7 (por ejemplo, CD80, CD86, CD274, B7-DC, B7-H2, B7-H3, or B7-H4), ligando de las moléculas de la familia de B7 (por ejemplo, CD28, CTLA-4, ICOS, PD-1, or BTLA), OX-40, ligando de OX-40, CD137, moléculas de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF) (por ejemplo, DR3, DR4, DR5, TNFR1 o TNFR2), moléculas de la familia del receptor de ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), familia de receptores de la familia TRAIL de moléculas (por ejemplo, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 o TRAIL-R4), activador receptor del ligando del factor nuclear kappa B (RANK), ligando de RANK, CD25, receptores del folato, mesotelina, citocinas [por ejemplo, IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, factor de crecimiento transformante (TGF) β o TNF α , o similar], receptores de dichas citocinas, quimiocinas (por ejemplo, SLC, ELC, 1-309, TARC, MDC o CTACK, o similares), o receptores de dichas quimiocinas.

La molécula diana apropiada del anticuerpo monovalente se ejemplifica mediante antígenos que pueden activarse mediante dimerización o aglutinación. Entre los ejemplos de la molécula que presenta dicha propiedad pueden incluirse receptores unidos a enzima, moléculas de adhesión celular o similares. Entre los receptores unidos a enzima pueden incluirse receptor tirosina cinasa, receptor asociado a tirosina cinasa, receptor serina-treonina cinasa y receptor guanilato ciclasa.

Entre los ejemplos del receptor tirosina cinasa pueden incluirse receptor de EGF, receptor de insulina, receptor de IGF-1, receptor de NGF, receptor de PDGF, receptor de M-CSF, receptor de FGF, receptor de VEGF, receptor de Eph o similares. Entre los ejemplos del receptor asociado a tirosina cinasa pueden incluirse receptor de citocina, receptor de Fc o similar. Además, entre los ejemplos de las moléculas de adhesión celular pueden incluirse cadherina, integrina o similares.

Entre los ejemplos específicos de los mismos pueden incluirse receptor de interleucina-1 (IL-R1), proteína accesoria de receptor de interleucina-1 (IL-1RAP), receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (c-Met), receptor del factor 1 estimulante de macrófagos (RON), receptor del factor derivado de plaquetas (PDGFR), proteína similar a molécula de adhesión de unión (JAML), proteína 5 similar a nectina (Nect5), receptor 1 del factor de necrosis tumoral (TNF-R1), receptor 2 del factor de necrosis tumoral (TNF-R2), receptor 1 del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL-R1), receptor 2 de ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL-R2), receptor 3 de muerte (DR3), receptor 6 de muerte (DR6), activador receptor de NF-kB (RANK), receptor del factor de crecimiento nervioso (NGFR), receptor de linfotoxina-beta (LT β R), OX40 (TNFRSF4), Fas (TNFRSF6), 4-1BB (TNFRSF9), Fn14 (TNFRSF12A), TACI (TNFRSF13B), BAFF-R (TNFRSF13C), HVEM (TNFRSF14), BCMA (TNFRSF17), GITR (TNFRSF18), TROY (TNFRSF19), receptor de ectodisplasina A1 (EDAR), receptor de ectodisplasina A2 (XEDAR), receptor expresado en tejidos linfoides (RELt), CD3, CD27, CD30, CD40, Fc α RI, Fc γ RIII, Fc ϵ RI, o similares.

Puede administrarse sola como agente terapéutico un fármaco que comprende la composición de proteína heterodímera de la presente invención. Sin embargo, preferentemente se mezcla con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables y se proporciona en forma de una preparación farmacéutica producida mediante un método arbitrario bien conocido en el campo técnico farmacéutico.

Resulta preferente utilizar la vía de administración que resulte más eficaz para el tratamiento. Entre los ejemplos del mismo pueden incluirse la administración oral y la administración parenteral, tal como la administración intraoral, la administración intratraqueal, la administración intrarrectal, la administración subcutánea, la administración intramuscular y la administración intravenosa. En el caso de una preparación de proteína heterodímera, resulta preferente la administración intravenosa.

Entre los ejemplos de la forma de administración puede incluirse pulverizador, cápsulas, comprimidos, gránulos, jarabe, emulsión supositorio, inyección, pomada, cintas o similares.

Entre los ejemplos de las preparaciones adecuadas para la administración oral pueden incluirse emulsiones, jarabes, cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos o similares.

Pueden prepararse preparaciones líquidas, tales como emulsiones y jarabes, utilizando como aditivos, agua, azúcares, tales como sacarosa, sorbitol, fructosa, glicoles, tales como polietilenglicol, propilenglicol, aceites, tales como aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja, antisépticos tales como ésteres de p-hidroxibenzoato,

sabores tales como sabor de fresa, menta, o similares.

Pueden prepararse cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos o similares utilizando, como aditivos, excipientes tales como lactosa, glucosa, sacarosa, manitol, agentes desintegrantes, tales como almidón, alginato sódico, lubricantes tales como estearato de magnesio, talco, ligantes tales como alcohol polivinílico, hidroxipropilcelulosa, gelatina, surfactantes tales como ésteres de ácidos grasos, plastificadores tales como glicerina, o similares.

Entre los ejemplos de las preparaciones adecuadas para la administración parenteral pueden incluirse inyecciones, supositorios, pulverizadores o similares.

Pueden prepararse inyecciones utilizando portadores que comprenden una solución salina, una solución de glucosa, o una mezcla de las mismas, o similar. Alternativamente, asimismo resulta posible preparar inyecciones de polvos mediante liofilización de la composición de proteína heterodímera según un método convencional y adición de cloruro sódico a la misma.

Pueden prepararse supositorios utilizando portadores tales como manteca de cacao, grasa hidrogenada, ácido carboxílico o similar.

Pueden prepararse pulverizadores utilizando la composición de proteína heterodímera sin modificación o utilizando un portador que no estimule la membrana mucosa bucal o de las vías respiratorias del receptor y pueda facilitar la absorción de la composición de proteína heterodímera mediante la dispersión de la misma en forma de partículas finas, o similar.

Entre los ejemplos específicos de portadores pueden incluirse lactosa, glicerina o similar. Asimismo resulta posible preparar aerosoles, polvos secos o similares según las propiedades de la composición de proteína heterodímera y los portadores utilizados. Para dichas preparaciones parenterales, asimismo pueden añadirse los aditivos anteriormente indicados para las preparaciones orales.

La dosis y la frecuencia de administración variarán dependiendo del efecto terapéutico deseado, la vía de administración, el periodo de tratamiento, la edad, el peso corporal o similares. Sin embargo, una dosis del principio activo para una persona adulta generalmente será de entre 10 µg/kg y 20 mg/kg al día.

Además, el efecto antitumoral de la composición de proteína heterodímera contra diversas células tumorales puede examinarse mediante pruebas *in vitro*, tales como la medición de la actividad de CDC y la medición de la actividad de ADCC. Además, entre los ejemplos de pruebas *in vivo* pueden incluirse experimentos antitumorales utilizando sistemas tumorales en un animal experimental tal como ratones.

Ejemplos

[Ejemplo 1] Construcción de vector de expresión de proteína heterodímera.

(1) Introducción de modificación de aminoácido en la región constante de la cadena H.

Se prepararon las secuencias de aminoácidos, IgG1-CH e IgG4-CH (SEC ID nº 6 y nº 8) (FIGS. 3A y 3B) se diseñaron respectivamente mediante la conexión de 6 residuos de histidina (en adelante denominado etiqueta His) al extremo C de las secuencias de aminoácidos (SEC ID nº 2 y nº 4) (secuencia de nucleótidos de ADN: SEC ID nº 1 y nº 3) de la IgG1 CH humana (Mol. Immunol. 37: 1035, 2000) y la IgG4 CH humana (J. Immunol. Methods 306: 151, 2005), y las secuencias de nucleótidos de ADN (SEC ID nº 5 y nº 7) codificante de las secuencias de aminoácidos. Se introdujeron las secuencias de reconocimiento de los enzimas de restricción Apal y BamHI en los extremos 5' y 3' de las secuencias de nucleótidos de ADN a fin de preparar fragmentos de ADN de IgG1-CH e IgG4-CH.

Los fragmentos IgG1-CH e IgG4-CH preparados y el plásmido pBluescript SK (fabricado por Stratagene) se trataron con los enzimas de restricción Apal y BamHI y después se llevó a cabo la ligación de cada uno. Se insertó cada fragmento en el vector pBluescript SK para preparar un vector de IgG1-CH y un vector de IgG4-CH.

Se preparó CH que comprendía una sustitución de residuo de aminoácido, mediante la utilización de los vectores de IgG1-CH1 e IgG4-CH preparados a modo de moldes y un kit de mutagénesis dirigida a sitio QuikChange (nombre comercial registrado) II XL (fabricado por Stratagene). De esta manera, se prepararon los vectores de IgG1-CH y de IgG4-CH, cada uno de los cuales incluía las sustituciones de residuos de aminoácido mostradas en la Tabla 1. El residuo de Cys en la posición 220, presente en el dominio bisagra de IgG1, es conocido que forma un enlace disulfuro intermolecular con residuos de Cys de la cadena L. De esta manera, se sustituyó por Ser para eliminar el enlace disulfuro.

Simultáneamente, el residuo de Cys en la posición 131, presente en el dominio CH1 de IgG4, es conocido que forma un enlace disulfuro intermolecular con residuos de Cys de la cadena L. Basándose en el hecho de que los residuos de Ser y Lys están situados en las posiciones 131 y 133 de IgG1, las secuencias parciales de C131/R133

que incluían el residuo de Cys que participa en el enlace disulfuro entre CH1-CL, se sustituyeron por C131S/R133K en el anticuerpo monovalente de tipo IgG4 preparado para las secuencias de tipo IgG1, a fin de eliminar el enlace disulfuro y reducir la antigenicidad.

Además, el residuo de Ser en la posición 228 del dominio bisagra de IgG4 y el residuo de Arg en la posición 409 del dominio CH3 de IgG4 es conocido que participan en el intercambio de brazos Fab específico de IgG4. Debido a que Pro y Lis están situados en las posiciones 228 y 409 de IgG1, respectivamente, se añadieron las sustituciones de residuos de aminoácido S228P y R409K a la cadena H del anticuerpo monovalente de tipo IgG4 con el fin de inhibir el intercambio de brazos Fab. Además, la sustitución de residuos de aminoácido L235E en IgG4 puede

reducir la actividad efectora.

En adelante, a menos que se indique particularmente lo contrario, la secuencia de aminoácidos se representa en código de 1 letra según el índice EU de Kabat et al. [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991]. Además, el residuo de aminoácido antes de la sustitución se indica antes del número y el residuo de aminoácido después de la sustitución se indica después del número. Las secuencias de nucleótidos de ADN de la cadena H de IgG se representan mediante las SEC ID nº 9, nº 11, nº 13, nº 15, nº 17 y nº 19, respectivamente.

[Tabla 1]

Sustitución de aminoácido introducida en CH							
Nombre de secuencia	ADN, SEC ID nº	Proteína, SEC ID nº	Subclase	CH1	Bisagra	CH2	CH3
1H0	9	10	IgG1	-	-	-	-
1H1	11	12	IgG1	-	C220S	-	-
4H0	13	14	IgG4	-	-	-	-
4H1	15	16	IgG4	C131S/R133K	-	-	-
4H2	17	18	IgG4	C131S/R133K	S228P	-	R409K
4H3	19	20	IgG4	C131S/R133K	S228P	L235E	R409K

(2) Introducción de modificación de aminoácido en la región constante artificial preparada mediante fusión de la región constante de cadena κ humana (CL) y Fc de anticuerpo IgG.

El extremo C de la región constante de la cadena κ humana (SEC ID nº 57 y nº 58) se unió con el dominio bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 de la región constante de la IgG1 humana o la IgG4 humana en este orden a fin de diseñar la secuencia de aminoácidos de CL-Fc (en adelante denominadas IgG1-L e IgG4-L) (SEC ID nº 22 y SEC ID nº 26) (figura 4A y 4B). A continuación, se prepararon las secuencias de nucleótidos de ADN (SEC ID nº 21 y SEC ID nº 25) codificantes de las secuencias de aminoácidos. En adelante, el segundo polipéptido que comprende CL-Fc se denomina cadena L en algunos casos.

Además, un dominio bisagra con una eliminación de los residuos de aminoácido EPKSC en las posiciones 216 a 220 según índice EU correspondientes a 5 residuos de aminoácido desde el extremo N del dominio bisagra se utilizó en IgG1-L (Figura 4A). Tal como se ha indicado anteriormente, existen residuos de Cys que participan en enlaces disulfuro intermoleculares con la cadena L en el dominio bisagra de IgG1. Para eliminarlos, se eliminó EPKSC.

A continuación, se prepararon secuencias génicas mediante la unión de la región 3' no traducida (UTR) de la cadena L incluida en el vector pKANTEX93 (J. Immunol. Methods 306: 151, 2005) y la unión de una secuencia de reconocimiento para el enzima de restricción KpnI al extremo 3'-terminal de CL-Fc, y la unión de una secuencia de reconocimiento para el enzima de restricción BsiWI al extremo 5'-terminal de la misma.

El fragmento génico BsiWI-KpnI preparado se clonó en un vector pTA2 (fabricado por TOYOBO) incluido en un kit Target Clone-Plus (fabricado por TOYOBO) a fin de preparar un vector IgG1-L y un vector IgG4-L.

Debido a que el residuo de Cys en la posición 214 de la cadena κ humana es conocido que forma un enlace disulfuro intermolecular con el residuo Cys de la cadena H, se sustituyó por Ser, eliminando de esta manera el enlace disulfuro. Además, el residuo de His en la posición 435 y el residuo de Tyr en la posición 436 del dominio CH3 de IgG1 e IgG4 es conocido que participan en la unión de la proteína A a un anticuerpo.

Arg y Phe se encuentran en las posiciones 435 y 436 de IgG3, y no presentan actividad de unión a la proteína A. De esta manera, las sustituciones de residuos de aminoácido H435R y Y436F se introdujeron en la cadena L para reducir la actividad de unión a proteína A de la cadena CL-Fc del anticuerpo monovalente.

Se preparó CL-Fc que comprendía una sustitución de residuo de aminoácido mostrada en la Tabla 2, mediante la utilización de los vectores de IgG1-L e IgG4-L a modo de moldes y un kit de mutagénesis dirigida a sitio QuikChange (nombre comercial registrado) IIXL (fabricado por Stratagene). Las secuencias de nucleótidos de ADN de la cada

CL-Fc se representan mediante las SEC ID nº 21, nº 23, nº 25, nº 27, nº 29, nº 31 y nº 33, respectivamente.

[Tabla 2]

Sustitución de aminoácido introducida en CL-Fc							
Nombre de secuencia	ADN, SEC ID nº	Proteína, SEC ID nº	Subclase	CH1	Bisagra	CH2	CH3
1L0	21	22	IgG1	-	Eliminación (216-220)	-	-
Nombre de secuencia	ADN, SEC ID nº	Proteína, SEC ID nº	Subclase	CH1	Bisagra	CH2	CH3
1L1	23	24	IgG1	C214S	Eliminación (216-220)	-	H435R/Y436F
4L0	25	26	IgG4	-	-	-	-
4L1	27	28	IgG4	C214S	-	-	-
4L2	29	30	IgG4	C214S	-	-	H435R/Y436F
4L3	31	32	IgG4	C214S	S228P	-	R409K/H435R/Y436F
4L4	33	34	IgG4	C214S	S228P	L235E	R409K/H435R/Y436F

(3) Construcción de vector de expresión de anticuerpo monovalente

Se preparó una proteína heterodímera que presentaba un dominio de unión monovalente (en adelante abreviado a 'anticuerpo monovalente') en la que la región variable de cadena H (VH) y la región variable de cadena L (VL) de anticuerpo IgG se unieron a CH y CL-Fc preparados en los ejemplos 1(1) y (2), de la manera siguiente. En adelante, el primer polipéptido se denomina cadena H y el segundo polipéptido se denomina cadena L en algunos casos.

Como proteínas de unión que deben unirse a CH y CL-Fc, se utilizaron las regiones variables del anticuerpo anti-CD20 humanizado B-Ly1 (B-HH2 y B-KV1, en adelante denominado GA101) (patente japonesa nº 2010-81940) y el anticuerpo anti-HER2 humAb4D5-8 (en adelante denominado 4D5) (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 4285, 1992). Como secuencias de nucleótidos de ADN y secuencias de aminoácidos, se utilizó GA101-VH (SEC ID nº 35 y nº 36), GA101-VL (SEC ID nº 37 y nº 38), 4D5-VH (SEC ID nº 39 y nº 40) y 4D5-VL (SEC ID nº 41 y nº 42).

La secuencia de reconocimiento para el enzima de restricción NotI se introdujo en los extremos 5' de las secuencias de nucleótidos de ADN codificantes de las secuencias de aminoácidos de VH del anticuerpo GA101 y del anticuerpo 4D5, y la secuencia de reconocimiento para el enzima de restricción Apal se introdujo en los extremos 3' de la misma a fin de preparar las secuencias de nucleótidos de ADN, que se insertaron en el sitio NotI-Apal de un vector pKANTEX93 (J. Immunol. Methods 306:151, 2005).

En consecuencia, se preparó el vector de expresión pKANTEX93/GA101-VH que incluye VH del anticuerpo humanizado anti-CD20 y el vector de expresión pKANTEX93/4D5-VH que incluía VH del anticuerpo humanizado anti-HER2.

A continuación, la secuencia de reconocimiento para el enzima de restricción BsiWI se introdujo en los extremo 5' de las secuencias de nucleótidos de ADN codificantes de las secuencias de aminoácidos de VL del anticuerpo GA101 y del anticuerpo 4D5, y la secuencia de reconocimiento para el enzima de restricción KpnI se introdujo en los extremos 3' de la misma a fin de preparar las secuencias de nucleótidos de ADN, cada una de las cuales se insertó en el sitio NotI-Apal del vector pKANTEX93/GA101-VH o del vector pKANTEX93/4D5-VH, respectivamente.

En consecuencia, se obtuvo el vector de expresión pKANTEX93/GA101 del anticuerpo humanizado anti-CD20 GA101 y el vector de expresión pKANTEX93/humAb4D5-8 del anticuerpo humanizado anti-HER2.

Las CH incluidas en el sitio Apal-BamHI del vector de expresión pKANTEX93/GA101 del anticuerpo humanizado anti-CD20 GA101 y el vector de expresión pKANTEX93/humAb4D5-8 del anticuerpo humanizado anti-HER2 se sustituyeron por una diversidad de IgG1-CH o IgG4-CH preparadas en el ejemplo 1(1), anteriormente.

A continuación, se preparó CL incluido en el sitio BsiWI-KpnI de los vectores de expresión por una diversidad de CL-Fc que se preparó mediante la fusión de dominio bisagra, dominio CH2 y dominio CH3 por la CL preparada en el ejemplo 1(2), anteriormente.

En consecuencia, se preparó una diversidad de vectores de expresión de anticuerpo monovalente compuestos por primer polipéptido que comprendía VH-CH y segundo polipéptido que comprendía VL-CL-Fc (Tabla 3). Además, las estructuras de las diversas moléculas de anticuerpo monovalente se muestran en la figura 5.

[Tabla 3]

Lista de combinación de las regiones variables CH y CL-Fc de diversos anticuerpos monovalentes.			
Región variable	CH	CL-Fc	Vector de expresión
humAb4D5-8	1H0	1L0	pKANTEX93/mvG1-1
GA101	1H1	1L1	pKANTEX93/mvG1-2
humAb4D5-8	4H0	4L0	pKANTEX93/mvG4-1
humAb4D5-8	4H1	4L1	pKANTEX93/mvG4-2
humAb4D5-8	4H1	4L2	pKANTEX93/mvG4-3
humAb4D5-8	4H2	4L3	pKANTEX93/mvG4-4
humAb4D5-8	4H3	4L4	pKANTEX93/mvG4-5

[Ejemplo 2] Construcción de vector de expresión de proteína heterodímera biespecífica.

Con el fin de construir una proteína heterodímera que presentase un dominio de unión divalente (en adelante denominado 'anticuerpo biespecífico'), se diseñó un anticuerpo biespecífico que estaba compuesto por primer polipéptido con VH unido al extremo N de CH y segundo polipéptido con VL unido al extremo N de CL-Fc y región variable de tipo Fv de cadena sencilla (scFv) en el extremo C del mismo (Figura 6 y nº 7).

El anticuerpo biespecífico presenta una actividad de unión divalente, en la que el dominio de unión compuesto por VH-VL se une específicamente a CD74 y scFv unido al extremo C del segundo polipéptido se une específicamente a Her2 o CD20. Se preparó el anticuerpo biespecífico de la manera siguiente.

(1) Construcción de vector de expresión de anticuerpo anti-CD74.

Como anticuerpo anti-CD74, se utilizó el anticuerpo humanizado anti-CD74 conocido H11 (patente US nº 7.312.318) (SEC ID nº 43 a nº 46). La secuencia de reconocimiento para un enzima de restricción se unió a los extremos 5' y 3' de VH y VL del anticuerpo humanizado anti-CD74 hLL1 de la misma manera que en el ejemplo 1(3), anteriormente, que se insertó en un vector pKANTEX93, preparando de esta manera un vector de expresión de anticuerpo humanizado anti-CD74, pKANTEX93/hLL1.

(2) Construcción de vector de expresión de anticuerpo monovalente de tipo IgG4 anti-CD74.

De la misma manera que en el ejemplo 2(1), se prepararon fragmentos de ADN de VH y VL del anticuerpo humanizado anti-CD74 hLL1, y se insertaron en el sitio NotI-ApaI y en el sitio EcoRI-BsiWI del vector pKANTEX93/mvG4-4 preparado en el ejemplo 1(3). En consecuencia, se preparó un vector de expresión de anticuerpo monovalente de tipo IgG4 anti-CD74, pKANTEX93/G4-4/hLL1.

(3) Construcción de vectores de expresión de anticuerpo biespecífico de CD74-H342 y de anticuerpo biespecífico de CD74-CD20.

Con el fin de preparar el anticuerpo biespecífico de CD74-HER2 y el anticuerpo biespecífico de CD74-CD20, que se preparó mediante fusión de scFv anti-HER2 o scFv anti-CD20 en el extremo C del segundo polipéptido del anticuerpo monovalente de tipo IgG4 anti-CD74 preparado en el ejemplo 2(2), anteriormente, se unieron CL-Fc y scFv entre sí mediante un conector compuesto por 15 residuos de aminoácido de [Ser-Gly-Gly-Gly-Gly]×3 (en adelante denominados 'conector GS') (SEC ID nº 47 y nº 48) a fin de diseñar CL-Fc-conector-VH-conector-VL (Figura 6 y 7). Además, se preparó cada scFv de la manera siguiente.

Las secuencias de VH y VL del anticuerpo humanizado anti-HER2 4D5-8 indicado en el ejemplo 1(3), anteriormente, se utilizaron en el anticuerpo anti-HER2, y las secuencias de VH y VL (SEC ID nº 49 a nº 52) del anticuerpo anti-CD20 2F2 (solicitud publicada de patente US nº 2004/0167319) se utilizaron para el anticuerpo anti-CD20.

Un codón de parada de CL-Fc del vector de expresión de anticuerpo monovalente de tipo IgG4 anti-CD74, pKANTEX93/G4-4/hLL1, se eliminó y, después, se diseñaron las secuencias de nucleótidos de ADN de CD74VL-CL-Fc-2F2scFv y CD74VL-CL-Fc-4D5scF, que se prepararon mediante la unión de la secuencia de nucleótidos de ADN codificante del conector GS, el ADN codificante de VH, el ADN codificante del conector compuesto por 15 residuos de aminoácido de [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]×3 y el ADN codificante de VL (SEC ID nº 53 a nº 56).

A continuación, se insertó scFv 4D5-8 anti-HER2 o scFv 2F2 anti-CD20 en el vector de expresión de anticuerpo monovalente de tipo IgG4 anti-CD74, pKANTEX93/G4-4/hLL1, a fin de preparar pKANTEX93/G4-4/hLL1-4D5-8scFv y pKANTEX93/G4-4/hLL1-2F2scFv, respectivamente.

[Ejemplo 3] Producción de la proteína heterodímera.

(1) Expresión de la proteína heterodímera.

Se llevó a cabo el cultivo celular a 37°C en un incubador con 5% de CO₂. Con el fin de expresar una diversidad de anticuerpos monovalentes y anticuerpos biespecíficos, se llevó a cabo la introducción de los vectores de expresión de la manera siguiente.

Se añadieron 8 µg de diversos vectores de expresión de anticuerpo monovalente o de vectores de expresión de anticuerpo biespecífico a 4×10⁶ células de ovario de hámster chino CHO/DG44 (Somatic Cell Mol.Genet., 12, 555, 1986) o a células CHO/DG44 con inactivación del gen de α1,6-fucosiltransferasa (FUT8) (en adelante abreviado a células 'CHO/FUT8KO') (patente US nº 6.946.292), y se introdujo un gen mediante el método de electroporación [Cytotechnology, 3, 133, 1990]. Los nombres de las células hospedadoras, vectores de expresión y proteínas heterodímeras que deben producirse se resumen en la Tabla 4.

La composición de proteína heterodímera preparada con células CHO presenta unión de fucosa a la N-acetilglucosamina incluida en el extremo reductor de la cadena de azúcar N-glucósido unida a Fc, mientras que la composición de proteína heterodímera preparada con células CHO/FUT8KO no presenta fucosa unida a la misma en la cadena de azúcar. En adelante, se añadió F (fucosilado) y DF (desfucosilado) al nombre de muestra de la composición de proteína heterodímera preparada con cada célula.

Tras la introducción génica, se cultivó cada célula en un medio IMDM (fabricado por GICO) [en adelante abreviado a 'IMDM-(10)] que contenía suero bovino dializado al 10% (en adelante abreviado a 'dFBS') durante 2 días y después se sustituyó el medio por IMDM-(10) [en adelante abreviado a 'IMDM-(10G)] que contenía 0.5 mg/ml de sulfato de G418 (NACALAI TESQUE, INC.) para continuar el cultivo, obteniendo de esta manera una estirpe celular resistente a G418.

Se suspendieron 3x10⁵ células/ml de estirpe celular resistente a G418 en IMDM-(10G) y se cultivaron durante 3 días y después se sustituyó el medio por Excell302 (fabricado por SAFC Biosciences) para llevar a cabo el cultivo durante 7 a 11 días y después se recuperó el sobrenadante de cultivo.

[Tabla 4]

Lista de combinación y nombres de muestra de vector y célula hospedadora.		
Vector de expresión	Célula hospedadora	
	CHO/DG44	CHO/FUT8KO
pKANTEX93/humAb4D5-8	-	4D5/IgG1 DF
KANTEX93/GA101	GA101/IgG1 F	GA101/IgG1 DF
pKANTEX93/mvG1-1	-	4D5/mvG1-1 DF
pKANTEX93/mvG1-2	GA101/mvG1-2 F	GA101/mvG1-2 DF
pKANTEX93/mvG4-1	-	4D5/mvG4-1 DF
pKANTEX93/mvG4-2	-	4D5/mvG4-2 DF
pKANTEX93/mvG4-3	-	4D5/mvG4-3 DF
pKANTEX93/mvG4-4	4D5/mvG4-4 F	4D5/mvG4-4 DF
KANTEX93/mvG4-5	4D5/mvG4-5 F	-
pKANTEX93/hLL1	hLL1/IgG1 F	-
pKANTEX93/G4-4/hLL1	hLL1/mvG4-4 F	-
pKANTEX93/G4-4/hLL1-4D5-8scFv	hLL1-4D5/mvG4-4 F	-
pKANTEX93/G4-4/hLL1-2F2scFv	hLL1-2F2/mvG4-4 F	-

(2) Purificación de la proteína heterodímera.

Los sobrenadantes de cultivo de los diversos anticuerpos monovalentes y anticuerpos biespecíficos obtenidos en el ejemplo 3(1), anteriormente, se pasaron por una columna empaquetada con portador ProSep-vA High Capacity (fabricado por MILLIPORE) a un caudal de 0.5 a 1.0 ml/min. La columna se lavó con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y después se eluyeron las proteínas utilizando tampón citrato 0.1 M de pH 5.0 a pH 3.0 e inmediatamente se neutralizó con tampón Tris-ácido clorhídrico 2 M (pH 8.0).

La purificación de 4D5/mvG4-3 DF y 4D5/mvG4-4 DF asimismo se llevó a cabo utilizando un portador de proteína G. El sobrenadante de cultivo se pasó por la columna empaquetada con portador ProSep-G (fabricado por MILLIPORE) a un caudal de 0.5 a 1.0 ml/min. La columna se lavó con PBS y después se eluyeron las proteínas utilizando tampón citrato 0.1 M de pH 5.0 a pH 2.5 e inmediatamente se neutralizó con tampón Tris-ácido clorhídrico 2 M (pH 8.0).

La fracción de elución que mostraba una concentración elevada de proteína se dializó frente a tampón (en adelante abreviado a 'tampón citrato') que contenía ácido cítrico 10 mM, el pH del cual se ajustó a 6.0 con hidróxido sódico y cloruro sódico 150 mM. Se recuperó la muestra y se concentró una muestra de baja concentración con un filtro de ultrafiltración (fabricado por MILLIPORE) y se esterilizó utilizando un filtro de 0.22 µm (fabricado por MILLIPORE). Se calculó la concentración de proteína a partir de la absorbancia a 280 nm (DO₂₈₀).

La muestra se purificó adicionalmente mediante cromatografía de filtración en gel y se utilizó en la prueba de actividad in vitro. Se conectó una columna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) a un sistema de cromatografía líquida de alta velocidad AKTA explore 10S (GE Healthcare) y se utilizó el tampón citrato como tampón de migración y se pasó la muestra por la columna a un caudal de 0.5 ml/min. Las fracciones detectadas como picos en torno a los 25 a 30 minutos se recuperaron y se utilizaron para el análisis.

(3) Análisis de SDS-PAGE de la proteína heterodímera.

Los diversos anticuerpos monovalentes purificados utilizando proteína A se sometieron a análisis de SDS-PAGE. Las muestras se ajustaron con un tampón (en adelante abreviado a 'tampón de muestras') que contenía dodecilsulfato sódico al 10%, glicerol al 50% y Tris-ácido clorhídrico 0.3 M (pH 6.8) que contenía ditiotreitól (DTT) 0 mM (condiciones no reductoras) o DTT 10 mM (condiciones reductoras), y se trató a 100°C durante 5 minutos y se cargó 1 µg/carril en un gel de poliacrilamida (ATTO, nº de catálogo E-T520L) para la electroforesis. Como marcador de peso molecular, se utilizaron estándares Precision plus protein all blue (Bio-Rad Laboratories Inc.) y se añadieron en una cantidad de 5 µl/carril. Tras la recuperación del gel, se llevó a cabo la tinción utilizando Quick CBB (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) siguiendo el manual de procedimientos del producto.

Como resultado, tanto la cadena H como la cadena L del anticuerpo monovalente presentaban un peso molecular de aproximadamente 50 kDa. En la SDS-PAGE, bajo las condiciones no reductoras, se identificó una pluralidad de bandas en 250 kDa o más, que se predijo que era un multímero, una banda en torno a aproximadamente 100 kDa que se predijo que era un monómero compuesto por dos cadenas polipeptídicas, y una banda en torno a aproximadamente 50 kDa que se predijo que era un halfmero compuesto por una cadena polipeptídica (FIGS. 8A (a) y (b), 8B).

En el anticuerpo monovalente de tipo IgG4 anti-HER2 4D5/mvG4-1 DF, se detectó una pluralidad de bandas de 250 kDa o más que se predijeron que era un multímero; se señala que se había formado una pluralidad de multímeros. Sin embargo, en 4D5/mvG4-2 DF compuesta por cadena H que incluye las sustituciones C131S/R133K y cadena L que incluye la sustitución C214S, apenas eran detectables multímeros (Figura 8A).

Por lo tanto, se encontró que en la proteína heterodímera compuesta por primer polipéptido que comprendía IgG4-CH y segundo polipéptido que comprendía IgG4-L, la sustitución en cadena H C131S/R133K, la sustitución en cadena L C214S y las sustituciones en cadena H C131S/R133K y en cadena L C214S con eliminación del residuo de Cys que participa en enlaces disulfuro entre IgG4-CH y Ck, podían inhibir la formación de multímeros causada por enlaces disulfuro intermoleculares.

De manera similar, no se detectaron bandas de multímeros en 4D5/mvG4-3 DF, 4D5/mvG4-4 DF, 4D5/mvG4-4 F y 4D5/mvG4-5 F con sustituciones en cadena H C131S/R133K y en cadena L C214S. Además, los multímeros se detectaron claramente en 4D5/mvG1-1 DF, pero no se detectaron en GA101/mvG1-2 DF y GA101/mvG1-2 F, incluyendo las sustituciones en cadena H C220S y en cadena L C214S.

Por lo tanto, se encontró que en la proteína heterodímera compuesta por primer polipéptido que comprendía IgG1-CH y segundo polipéptido que comprendía IgG1-L, la sustitución en cadena H C220S, la sustitución en cadena L C214S y las sustituciones en cadena H C220S y en cadena L C214S con eliminación de residuos de Cys que participan en enlaces disulfuro entre IgG1-CH y Ck, podían inhibir la formación de multímeros.

Por otra parte, en las bandas 4D5/mvG4-1 DF, 4D5/mvG4-2 DF y 4D5/mvG4-3 DF, se detectaron bandas en torno a aproximadamente 50 kDa que se predijo que eran un halfmero. Sin embargo, en 4D5/mvG4-4 DF, 4D5/mvG4-4 F y 4D5/mvG4-5 F, incluyendo las sustituciones S228P/R409K en tanto cadena H como cadena L, no se reconocieron bandas de halfmero. Por lo tanto, se observó que la sustitución S228P, la sustitución R409K y las sustituciones S228P/R409K en la cadena H y en la cadena L eran capaces de inhibir la formación de halfmeros (Figura 8B).

Estos resultados sugieren que la composición de proteína heterodímera de la presente invención es una composición que presenta cantidades reducidas de multímero, halfmero y multímero/halfmero generados durante la producción de la proteína heterodímera.

[Ejemplo 4] Análisis de componentes del anticuerpo monovalente.

(1) Separación de componentes mediante cromatografía de intercambio catiónico.

Con el fin de llevar a cabo un análisis de componentes detallado del anticuerpo monovalente de tipo IgG4 anti-HER2 4D5/mvG4-2 DF que se había purificado mediante purificación por afinidad utilizando una columna de proteína A en el ejemplo 3 indicado anteriormente, se llevó a cabo una cromatografía de intercambio catiónico. 4D5/mvG4-2 DF es un anticuerpo monovalente de tipo IgG4 que incluye la sustitución de residuos de aminoácido C214S en CL y las sustituciones de residuos de aminoácido C133S/R133K en CH1 y que no presenta fucosa que esté unida a la N-acetilglucosamina incluida en el extremo reductor de la cadena de azúcar de N-glucósido unida

a Fc.

Se conectó una columna WCX-10 (fabricada por Dionex) a un equipo de análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (serie LC-10Avp, SHIMADZU Corporation) y se utilizó un tampón de fosfato sódico 10 mM, a pH 6.2 (en adelante abreviado a 'tampón A') como tampón inicial y un tampón de fosfato sódico 10 mM y cloruro sódico 500 mM a pH 6.2 (en adelante abreviado a 'tampón B') como tampón de elución.

Tras aplicar la muestra, se aplicó el tampón A a un caudal de 1 ml/min y se llevó a cabo el análisis durante 30 minutos con un incremento de 1% de la proporción de tampón B cada minuto. A continuación, se sustituyó el tampón de migración por el tampón B y se llevó a cabo el análisis durante 10 minutos.

Los resultados de la cromatografía de intercambio catiónico de 4D5/mvG4-2 DF mostraron que se separaban tres grupos de pico de (1), (2) a (6) y (7) a (10) tal como se muestra en la figura 9, indicando que una pluralidad de componentes se encontraba incluida en la proteína purificada con proteína A. Por lo tanto, los picos (1) a (10) se fraccionaron adicionalmente y se llevó a cabo el análisis de cada pico.

(2) Clasificación de componentes mediante análisis de transferencia western.

De la misma manera que en el ejemplo 3(3), anteriormente, se añadieron 40 ng a cada carril bajo condiciones no reductoras para llevar a cabo la electroforesis en SDS-PAGE y se colocó una membrana de PVDF y un gel entre los papeles de filtro embebidos en un tampón de transferencia que contenía Tris 0.1 M, glicina 0.2 M y metanol al 20%, y se transfirieron las proteínas sobre la membrana de PVDF (2.5 mA/cm² durante 40 minutos). Después, se utilizó PBS que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 1% (en adelante abreviado a 'BSA-PBS') para bloquear la membrana de PVDF con la proteína transferida.

Como anticuerpo de detección, se utilizó un anticuerpo anti-etiqueta His marcado con peroxidasa diluida 1000 veces (en adelante abreviado a 'HRP') (NACALAI TESQUE, INC., nº de cat. 04546-34) para la detección de cadena H, anticuerpo anti-cadena κ humana marcada con peroxidasa diluida 5000 veces (SIGMA, nº de cat. 7164) para la detección de cadena L y anticuerpo anti-IgG humana marcado con peroxidasa diluida 5000 veces (American Qualex, nº de cat. A 110PD) para la detección de IgG, y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora.

Después, la membrana de PVDF se lavó con PBS que contenía Tween-20 al 0.1% (en adelante abreviado a 'Tween-PBS') y se hizo reaccionar con un sustrato de duración prolongada SuperSignal West Dura (fabricado por Thermo Scientific), seguido de la detección utilizando un analizador de imágenes (fabricado por FUJI FILM).

Los resultados del análisis de transferencia western (Figura 10) de los picos (1) a (10) detectados en la cromatografía de intercambio catiónico (Figura 9) de 4D5/mvG4-2 DF mostraron que las bandas en torno a 100 kDa predichas como monómero compuesto por dos cadenas polipeptídicas se detectaban en los picos (1) y (3). Reaccionaban tanto con el anticuerpo anti-cadena κ humana como con el anticuerpo anti-IgG_h, pero no reaccionaban con el anticuerpo anti-etiqueta His, indicando que el monómero de homodímero cadena L-cadena L (en adelante abreviado a 'forma LL'), comprendiendo sólo cadena L y ninguna cadena H incluyendo etiqueta His.

Además, se detectaron en los picos (8) y (9), bandas en torno a 100 kDa predichas como un monómero. Se hicieron reaccionar con todos los anticuerpos de detección de anticuerpo anti-cadena κ humana, anticuerpo anti-etiqueta His y anticuerpo anti-IgG_h, indicando que el monómero de heterodímero HL (en adelante abreviado a 'forma HL') comprendía cadena L y cadena H incluyendo etiqueta His (Figura 10).

Además, los resultados de detección con anticuerpo anti-IgG_h marcada con peroxidasa mostraron que los componentes de los picos (1), (3) y los picos (8), (9) presentaban pesos moleculares diferentes y podían separarse mediante SDS-PAGE. Las muestras de los demás picos, (2), (4) a (7) y (10), eran inferiores a los límites de detección del análisis de transferencia western y, de esta manera, no pudieron identificarse sus componentes.

(3) Separación de heterodímero y homodímero a partir de una mezcla.

En la sección anterior, se propuso que las formas HL y LL se incluyesen en 4D5/mvG4-2 DF purificado con proteína A. A continuación, con el fin de obtener productos estándares de formas HL y LL, se analizó mediante cromatografía de intercambio catiónico cada una de las fracciones obtenidas mediante la modificación del pH de elución durante la purificación con proteína A. Como resultado, la fracción X, que era una de las fracciones eluidas a pH 3.5 durante la purificación con proteína A, se identificó que presentaban los picos (8) y (9) como un componente principal. La fracción Y, que se eluyó a pH 5.0 durante la purificación con proteína A, se identificó que presentaba el pico (1) como componente principal.

Tal como se muestra en la Tabla 5, el contenido de forma HL en la fracción X era de 74.9% o superior, y el contenido de forma LL en la fracción Y era de 93.8% o superior. En el análisis posterior, se utilizó la fracción X como control de la muestra que incluía la forma HL como el componente principal, y se utilizó la fracción Y como control de la muestra que incluía la forma LL como el componente principal. Además, los valores en la Tabla 5 representa una

proporción de superficies (%) y 'n.d.' representa 'no analizado'.

[Tabla 5]

Análisis de componentes de cada fracción de mvG4-2 DF mediante cromatografía de intercambio catiónico.			
Pico nº	Componente	mvG4-2 DF	
		Fracción X	Fracción Y
(1)	LL	1	88.6
(2)	no identificado	n.d.	1.5
(3)	LL	n.d.	5.2
(4)	no identificado	n.d.	1.3
(5)	no identificado	n.d.	2.1
(6)	no identificado	5.7	1.3
(7)	no identificado	10.3	n.d.
(8)	HL	24.2	n.d.
(9)	HL	49.9	n.d.
(10)	no identificado	8.8	n.d.
Total (%)	LL	1	93.8
	HL	74.1	n.d.
	no identificado	24.9	6.2

5

(4) Purificación específica de la proteína heterodímera.

Con el fin de confirmar la separación y purificación específicas de la proteína heterodímera que incluía el segundo polipéptido que comprendía CL-Fc que presentaba una actividad de unión reducida al ligante de CH, se utilizó proteína G y proteína A para llevar a cabo la purificación, y se compararon las proteínas purificadas.

10

Es conocido que la proteína G se une a cualquier subclase de IgG humana y la IgG3 humana que no presenta actividad de unión a proteína A es capaz de unirse a la proteína G. En la purificación con proteína G, por lo tanto, se sugería que todas las moléculas de anticuerpos pueden purificarse con independencia de la presencia o ausencia de sustituciones de residuos de aminoácido en el presente ejemplo en el sitio de unión a proteína A.

15

En el presente ejemplo, se preparó una proteína heterodímera (4D5/mvG4-3 DF) que incluía CL-Fc que presentaba una actividad de unión a proteína A reducida, mediante la sustitución de His en la posición 435 y de Tyr en la posición 436 según el índice EU de IgG1, las cuales es conocido que participan en la unión a la proteína A, por Arg y Phe, que son residuos de aminoácido de IgG3 humana que no presentan actividad de unión a proteína A, seguido del análisis.

20

De la misma manera que en el ejemplo 3(3) y en el ejemplo 4(2), anteriormente, se llevó a cabo el análisis de SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras y transferencia western.

25

En la SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, los resultados de llevar a cabo electroforesis durante un tiempo prolongado mostraron que la fracción X de 4D5/mvG4-2 que incluye principalmente la forma HL presentaba una banda en la región de peso moleculares más elevados que la fracción Y de 4D5/mvG4-2 DF, que incluye principalmente la forma LL. Por lo tanto, se encontró que la banda en la región de peso molecular elevado es la forma HL y la banda en la región de peso molecular bajo es la forma LL. Además, a medida que se prolongaba el tiempo de electroforesis, podían separarse el heteromonómero HL y el homomonómero LL (figura 11).

30

De manera similar, los resultados de la transferencia western utilizando anticuerpo anti-cadena κ mostraron que la fracción X de 4D5/mvG4-2 no presentaba una banda en la región de pesos moleculares más elevados que la fracción Y de 4D5/mvG4-2 (figura 11).

35

Además, con respecto a 4D5/mvG4-3 DF purificado utilizando proteína G o proteína A, cada uno de los productos purificados se sometió a SDS-PAGE y se llevó a cabo una comparación.

40

En primer lugar, se examinaron las condiciones de purificación de 4D5/mvG4-3 DF utilizando cada portador y, como resultado, se encontró que todas las proteínas resultaban eluidas por la proteína G a pH 2.5 y por la proteína A a pH 3.0.

En 4D5/mvG4-3 DF (producto purificado con proteína G) obtenido llevando a cabo la elución con proteína G a pH 2.5, se observaron las dos bandas de las formas HL y LL, indicando que 4D5/mvG4-3 DF purificado con proteína G incluye ambas formas, HL y LL, como 4D5/mvG4-2 DF (figura 11, SDS-PAGE). Por lo tanto, se encontró que ambas moléculas, HL y LL, se expresan en 4D5/mvG4-3 DF preparado mediante la adición de las sustituciones de residuos de aminoácido H435R y Y436F a 4D5/mvG4-2.

45

Por otra parte, los resultados de la SDS-PAGE de 4D5/mvG4-3 DF (producto purificado con proteína A) obtenida

mediante elución del mismo sobrenadante de cultivo que en la purificación con proteína G a pH 3.0 utilizando proteína A mostró que se observaba la banda de HL, pero que apenas se observaba la banda de LL, y los resultados del análisis de transferencia western con anticuerpo anti-cadena κ asimismo mostraron que sólo se observaba la banda de HL de la región de peso molecular elevado (figura 11).

Por lo tanto, se encontró que las células que expresaban 4D5/mvG4-3 DF, expresan heterodímero HL y homodímero LL en el sobrenadante de cultivo, mientras que la proteína heterodímera HL de 4D5/mvG4-3 DF puede purificarse selectivamente mediante purificación con proteína A (figura 11).

Por otra parte, la forma LL, así como la forma HL, pueden purificarse con proteína A a partir de 4D5/mvG4-2 DF que no presenta las sustituciones de residuos de aminoácido H435R y Y436F en la cadena L. Se indica que sólo la forma HL puede purificarse específicamente respecto de la forma LL, ya que ésta no presenta actividad de unión a proteína A y la forma HL presenta actividad de unión a proteína A, mediante la adición de las sustituciones de aminoácidos H435R y Y436F a la cadena L.

[Ejemplo 5] ELISA de detección de proteína heterodímera.

(1) ELISA de tipo sándwich de anticuerpo monovalente de tipo IgG4.

Para la detección de la forma HL, se examinó el establecimiento de un ensayo de inmunosorción ligada a enzima de tipo sándwich (ELISA). El anticuerpo monovalente preparado en el presente ejemplo es una proteína heterodímera que está compuesta por cadena H que presenta una etiqueta de His en el extremo C de CH y cadena L preparada mediante fusión de Fc y cadena C κ , tal como se muestra en la estructura de la figura 5 y, de esta manera, podría utilizarse anticuerpo anti-etiqueta de His como el anticuerpo de unión específica a cadena H y el anticuerpo anti-cadena κ humana podría utilizarse como el anticuerpo de unión específica a cadena L.

El anticuerpo anti-etiqueta de His (QIAGEN, n° de cat. 34670) se inmovilizó sobre una placa de ELISA (2 μ g/ml, 50 μ l/pocillo, 4°C, 16 horas) y se lavó con PBS, seguido de bloqueo con BSA-PBS (100 μ l/pocillo, temperatura ambiente, 1 hora).

Tras desechar la solución de bloqueo, se hicieron reaccionar (50 μ l/pocillo, temperatura ambiente, 2 horas) diversas concentraciones del anticuerpo monovalente 4D5/mvG4-2 DF, fracción X, 4D5/mvG4-2 DF fracción Y y 4D5/mvG4-3 DF, 4D5/mvG4-4F y 4D5/mvG4-5 F purificado con proteína A.

A continuación, tras el lavado con PBS que contenía Tween-20 al 0.05% (en adelante abreviado a 'Tween-PBS'), se hizo reaccionar anticuerpo anti-cadena κ humana marcado con peroxidasa de rábano picante (en adelante abreviado a 'HRP') (SIGMA, n° de cat. A7164) (50 μ l/pocillo, 2 horas).

A continuación, tras el lavado con Tween-PBS, se añadieron 50 μ l/pocillo de sustrato cromogénico ABTS (solución de [ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico)ammonio] [1 mmol/l ABTS/0.1 moles/l de tampón citrato (pH 4.2), H₂O₂ al 0,1%] para revelar un color a temperatura ambiente durante 15 minutos. El revelado de color se terminó mediante la adición de 50 μ l/pocillo de solución acuosa de SDS al 5%. Se determinó la absorbancia en un lector de placas a 415 nm con una referencia a 490 nm. Se utilizó SoftMax (Molecular Devices) para el análisis de los datos. El experimento se repitió tres veces.

En el sistema de ELISA de unión, la fracción X compuesta por heterodímero HL de 4D5/mvG4-2 DF se utilizó como un control positivo, y la fracción Y compuesta por homodímero LL de 4D5/mvG4-2 DF se utilizó como un control negativo.

Como resultado, 4D5/mvG4-3 DF, 4D5/mvG4-4 F y 4D5/mvG4-5 F obtenidos mediante purificación con proteína A se unieron equivalentemente a la fracción X de 4D5/mvG4-2 DF, pero apenas se unieron a la fracción Y de 4D5/mvG4-2 DF (figura 12).

Por lo tanto, se encontró que la totalidad de los anticuerpos monovalentes de tipo IgG4, 4D5/mvG4-3 DF, 4D5/mvG4-4 F y 4D5/mvG4-5 F, son proteínas heterodímeras compuestas por primer polipéptido que comprende CH-etiqueta de His y segundo polipéptido que comprende CL-Fc (figura 12).

Además, se encontró que el heterodímero HL puede purificarse específicamente de la totalidad de los anticuerpos monovalentes de tipo IgG4 de 4D5/mvG4-3 DF preparados mediante la adición además de las sustituciones de aminoácidos H435Y y R436F a la cadena L en la proteína heterodímera HL del anticuerpo monovalente de tipo IgG4 4D5/mvG4-2 DF, 4D5/mvG4-4 F preparado mediante adición además de las sustituciones de aminoácidos S228P/R409K y 4D5/mvG4-5 F preparado mediante la adición además de la sustitución de aminoácido L235E en 4D5/mvG4-4 F, mediante purificación con proteína A (Figura 12).

Por lo tanto, el efecto de que la forma heterodímero HL puede purificarse específicamente utilizando proteína A mediante la adición de las sustituciones de aminoácidos H435Y y R436F a la cadena L se mantiene, aunque se incluyen las sustituciones de aminoácidos S228P/R409K y L235E.

(2) ELISA de tipo sándwich de anticuerpo monovalente de tipo IgG1.

De la misma manera que en el ejemplo 5(1) indicado anteriormente, las fracciones purificadas con proteína A de anticuerpo monovalente de tipo IgG1 4D5/mvG1-1 DF se sometieron a ELISA de tipo sándwich.

Como resultado, las fracciones 1 a 4 eluidas en cada pH mediante purificación con proteína A mostraron diferentes reactividades en el ELISA de tipo sándwich, indicando que contenidos diferentes de heterodímero HL en las fracciones (figura 13A).

Por lo tanto, se sugirió que la fracción 2 que mostraba el contenido de proteína más elevado incluía ambas formas, HL y LL. Además, la fracción 1, que mostraba la reactividad más elevada, se utilizó como 4DD5/mvG1-1 DF en la prueba posterior de actividad *in vitro*.

Por otra parte, el anticuerpo monovalente de tipo IgG1 GA101/mvG1-2 F y GA101/mvG1-2 DF que incluye las sustituciones de residuos de aminoácido H435R y Y436F, mostraron una reactividad equivalente a la de la fracción X de 4D5/mvG4-2 DF que incluía el heterodímero HL como un componente principal (figura 13B).

Por lo tanto, se demostró que en los anticuerpos monovalentes de tipo IgG1 GA101/mvG1-2 F y GA101/mvG1-2 DF que se habían purificado mediante la utilización de proteína A, se purificaban específicamente los heterodímeros HL (figura 13B).

Estos resultados sugieren que en el anticuerpo monovalente de tipo IgG1, así como en el anticuerpo monovalente de tipo IgG4, las proteínas heterodímeras que incluyen las sustituciones de residuos de aminoácido H435R/Y436F en la cadena L pueden purificarse específicamente con proteína A.

[Ejemplo 6] Actividad de unión de proteína heterodímera a células de cáncer.

Las actividades de unión de los anticuerpos monovalentes de tipo IgG1 y de tipo IgG4 a las células de cáncer se confirmaron mediante un experimento de inhibición de la unión de cada anticuerpo IgG1. En primer lugar, como anticuerpo de control, los anticuerpos IgG1 anti-CD20 GA101/IgG1 F, IgG1 anti-HER2 Herceptina (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 4285) e IgG1 humana (fabricada por Millipore, AG502) se marcaron con Alexa488 utilizando un kit de marcaje con Alexa488 (Invitrogen, A20181) para preparar GA101_Alx, Herceptina_Alx e hIgG1_Alx.

Se utilizó la estirpe celular de linfoma humano positivo para CD20 Raji (JCRB9012) y la célula de cáncer de mama humano positivo para HER2 SK-BR-3 (ATCC nº HTB-30) para llevar a cabo una citometría de flujo. El experimento se repitió dos veces. Se suspendieron 1×10^5 células en un tampón PBS que contenía BSA al 1%, tetraacetato de etilendiamina (EDTA) al 0.02% y azida sódica al 0.05% (en adelante abreviado a 'tampón de FACS') y 2.0 µg/ml de anticuerpo marcado con Alexa y se añadieron 210 nM a 1.68 nM de anticuerpo IgG1 no marcado o diversos anticuerpos monovalentes a la suspensión simultáneamente, y se hicieron reaccionar a 4°C bajo condiciones de agitación durante 1.5 horas.

Además, se utilizó hIgG1_Alx como un control negativo. Tras el lavado con tampón de FACS, se utilizó para las mediciones un citómetro de flujo Cytomics FC 500 MPL (Beckman Coulter).

Como resultado, el anticuerpo hIgG1 de control negativo no inhibió la unión del anticuerpo anti-HER2 Herceptina_Alx a las células SK-BR-3, pero el anticuerpo IgG1 anti-HER2 Herceptina y el anticuerpo IgG1 anti-HER2 desfucosilado 4D5/IgG1 df, el anticuerpo monovalente de tipo IgG anti-HER2 4D5/mvG1-1 DF, el anticuerpo monovalente de tipo IgG4 anti-HER2 4D5/mvG4-4 F y 4D5/mvG4-5 F inhibieron la unión de Herceptina_Alx a SK-BR-3 de una manera dependiente de la concentración de los anticuerpos (Figura 14A).

Por lo tanto, se encontró que el anticuerpo monovalente anti-HER2 se unía específicamente a HER2. Se observó que la proteína heterodímera preparada basándose en la proteína de andamiaje heterodímero (HSP) compuesta por CH y CL-Fc es una proteína heterodímera que presenta una actividad de unión monovalente.

Sin embargo, el efecto inhibitorio de la unión al anticuerpo monovalente por unidad de concentración molar era inferior al del anticuerpo IgG1 anti-HER2 Herceptina y 4D5/IgG1 DF (figura 14A).

Por otra parte, en la estirpe celular de linfoma positivo para CD20 Raji, de manera similar, el anticuerpo hIgG1 de control negativo no inhibió la unión de GA101_Alx a las células Raji, mientras que el anticuerpo IgG1 anti-CD20 GA101, el anticuerpo IgG1 anti-CD20 desfucosilado GA101/IgG1 DF, los anticuerpos monovalentes de tipo IgG1 anti-CD20, GA101/mvG1-2 F y GA101/mvG1-2 DF, inhibieron la unión de GA101_Alx a las células Raji de una manera dependiente de la concentración de los anticuerpos (figura 14B).

Por lo tanto, se encontró que el anticuerpo monovalente anti-CD20 se unía específicamente a CD20. Al igual que el anticuerpo de HER2, el efecto inhibitorio de la unión al anticuerpo monovalente por unidad de concentración molar era inferior al de los anticuerpos IgG1 anti-CD20 GA101/IgG1 F y GA101/IgG1 DF (figura 14B).

[Ejemplo 7] Citotoxicidad dependiente de anticuerpos de la proteína heterodímera.

(1) Citotoxicidad dependiente de anticuerpos del anticuerpo monovalente anti-HER2.

Se midió la actividad de ADCC de los anticuerpos mediante el método descrito en el documento n° WO 2007/011041 y se repitió la medición tres veces.

Se utilizaron las células de cáncer de mama humano positivo para HER2 SK-BR-3 (ATCC n° HTB-30), el cáncer de mama humano BT-20 (ATCC n° HTB-19), las células de linfoma humano positivo para CD20 Raji (JCRB9012), las células de linfoma de Burkitt ST-486 (ATCC n° CRL-1647) y las células de leucemia de células B crónica MEC-1 (DSMZ n° ACC-497) como células diana y se utilizaron células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) procedentes de un donante sano como célula efectora.

El experimento se llevó a cabo en una proporción de células efectoras a células diana de 1:25 y se calculó la citotoxicidad (%) mediante la ecuación siguiente.

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = 100 \times (S - Ab) / (Max - T)$$

S=absorbancia de pocillo de reacción de muestra-absorbancia de pocillo de medio
 Ab=absorbancia de pocillo sin adición de anticuerpo-absorbancia de pocillo de medio
 T=absorbancia de pocillo diana-absorbancia de pocillo de medio
 Max=absorbancia de pocillo de 100% de reacción-absorbancia de pocillo de control de 100% de reacción

Se utilizó hlgG1 como control negativo y el anticuerpo IgG1 anti-HER2 Herceptina y el anticuerpo IgG1 anti-HER2 defucosilado 4D5/IgG1 DF como controles positivos, y se utilizaron PBMC preparadas a partir de otro donante voluntario como células efectoras. El pocillo que incluía las células diana lisadas en Triton X-100 se utilizó como pocillo de reacción de 100%.

Como resultado, el anticuerpo monovalente anti-HER2 4D5/mvG1-1 DF (fracción 1 purificada con proteína A) mostró la actividad de ADCC más elevada de una manera dependiente de la concentración del anticuerpo, equivalente a la del anticuerpo IgG1 anti-HER2 4D5/IgG1 DF (figura 15A). En contraste, ambos anticuerpos monovalentes de tipo IgG4 anti-HER2, mvG4-4F y mvG4-5F, no mostraron actividad de ADCC (figura 15B).

Por lo tanto, se encontró que la proteína heterodímera compuesta por primer polipéptido que comprendía IgG1-CH y segundo polipéptido que comprendía CL(IgG1-L) preparado mediante fusión de IgG1-Fc, era capaz de proporcionar actividad de ADCC, y la proteína heterodímera compuesta por primer polipéptido que comprendía IgG4-CH y segundo polipéptido que comprendía CL(IgG4-L) preparado mediante fusión de IgG4-Fc, es capaz de excluir la actividad de ADCC.

Además, aunque el anticuerpo monovalente de tipo IgG1 presenta un sitio de unión a antígeno reducido de divalente a monovalente, en comparación con un anticuerpo IgG1, mostró efectos equivalentes a los del anticuerpo IgG1 bajo las mismas condiciones, indicando que puede prepararse un anticuerpo monovalente que presente la actividad de unión bivalente innecesaria reducida, reteniendo simultáneamente la actividad de ADCC.

(2) Citotoxicidad dependiente de anticuerpos del anticuerpo monovalente anti-CD20.

De la misma manera que en el ejemplo 7(1) indicado anteriormente, se utilizó hlgG1 como el control negativo y el anticuerpo IgG1 anti-CD20 GA101/IgG1 F y el anticuerpo IgG1 anti-CD20 defucosilado/IgG1 DF como controles positivos. Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando PBMC preparadas a partir de un donante sano.

Como resultado, el anticuerpo monovalente defucosilado de tipo IgG1 anti-CD20 GA101/mvG1-2 DF mostró una actividad de ADCC notablemente incrementada en comparación con el anticuerpo monovalente de tipo IgG1 anti-CD20 GA101/mvG1-2 F [Figuras 16(A) a (c)].

Es conocido que la eliminación de la fucosa nuclear de la IgG humana incrementa la actividad de ADCC. La eliminación de la fucosa nuclear del anticuerpo monovalente de tipo IgG1 compuesto por primer polipéptido que comprendía CH y segundo polipéptido que comprendía CL-Fc asimismo se encontró que incrementaba la actividad de ADCC. Es decir, la actividad de ADCC de la proteína heterodímera compuesta por primer polipéptido que incluye CH y segundo polipéptido que comprende CH-Fc se encontró que resultaba incrementada o reducida por la modificación del contenido de fucosa nuclear de unión a Fc.

Además, la potencia inducida de actividad de ADCC por unidad de concentración molar de anticuerpo monovalente defucosilado de tipo IgG1 anti-CD20 GA101/mvG1-2 DF resultaba reducida en comparación con la del anticuerpo defucosilado IgG1 anti-CD20 GA101/IgG1 DF, aunque la eficacia máxima era prácticamente equivalente. Es decir,

aunque el anticuerpo monovalente de tipo IgG1 anti-CD20 presenta un sitio de unión a antígeno reducido de divalente a monovalente, en comparación con el anticuerpo IgG1 anti-CD20, pueden obtenerse efectos equivalentes a los del anticuerpo IgG1 mediante el incremento del número de moléculas de anticuerpo monovalente bajo las mismas condiciones.

[Ejemplo 8] Producción de proteína heterodímera divalente.

(1) Preparación de anticuerpo biespecífico.

Como proteína heterodímera divalente, se preparó un anticuerpo biespecífico que estaba compuesto por un primer polipéptido que comprendía la cadena H del anticuerpo de CD74 y un segundo polipéptido que comprendía el anticuerpo scFv anti-CD20 o el anticuerpo scFv anti-HER2 unido al extremo C del anticuerpo VL-Fc de CD74 y el anticuerpo monovalente de tipo IgG4 anti-CD74 hLL1/mvG4-4 F.

El vector de expresión de anticuerpo biespecífico del ejemplo 2(3) se utilizó para expresar y purificar los anticuerpos biespecíficos de la misma manera que en el ejemplo 3, obteniendo de esta manera el anticuerpo biespecífico de CD74-HER2, el anticuerpo biespecífico de CD74-CD20 y el anticuerpo monovalente de tipo IgG4 anti-CD74 hLL1/mvG4-4 F.

Los resultados de la SDS-PAGE mostraron que las composiciones de hLL1/mvG4-4 F, hLL1-4D5/mvG4-4 F y hLL1-2 F2/mvG4-4 F presentaban una pureza elevada e incluían pocas impurezas, productos de degradación y agregados (figura 17).

(2) Evaluación de la actividad de unión de HER2 humano recombinante y CD74 mediante ELISA.

En el ensayo, se utilizó una placa de 96 pocillos para ELISA (Greiner). Se dispensaron 2 µg/ml de HER2-Fc humano recombinante (R&D Systems) o 2 µg/ml de CD74 (Santa Cruz Biotechnology) en una cantidad de 50 µl/pocillo y se dejaron a 4°C durante la noche para la adsorción. La placa se lavó con PBS y después se añadieron 100 µl/pocillo de BSA-PBS y se dejaron a temperatura ambiente durante 1 hora para bloquear los grupos activos restantes.

Después, se desechó el BSA-PBS, y se dispensaron diversas concentraciones del anticuerpo IgG1 anti-HER2 Herceptina F, el anticuerpo IgG1 anti-CD74 hLL1 F o el anticuerpo biespecífico de CD74-HER2 hLL1-4D5/mvG4-4F como anticuerpos primarios en la placa en una cantidad de 50 µl/pocillo y se dejaron a temperatura ambiente durante 1 hora.

La placa se lavó con Tween-PBS y después se dispensó un anticuerpo anti-cadena κ humana marcada con peroxidasa (Southern Biotech) como anticuerpo secundario en una cantidad de 50 µl/pocillo y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó con Tween-PBS y se añadieron 50 µl/pocillo de sustrato cromogénico ABTS (solución de [ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazol-6-sulfónico)amónio] [ABTS 1 mmol/l/tampón citrato 0.1 moles/l] (pH 4.2), H₂O₂ al 0,1%) para el revelado del color.

La reacción se terminó mediante la adición de 50 µl/pocillo de solución al 5% de dodecilsulfato sódico (SDS). Se determinó la absorbancia (DO415-490) utilizando un lector de placas (SPECTRA Max 340PC, Molecular Devices) a una longitud de onda de muestras de 415 nm y una longitud de onda de referencia de 490 nm.

Como resultado, el anticuerpo biespecífico de CD74-H342 hLL1-4D5/mvG4-4F se unía a la proteína HER2, al igual que el anticuerpo IgG1 anti-HER2 Herceptina F. Además, hLL1-4D5/mvG4-4 F se unía a la proteína CD74, al igual que el anticuerpo IgG1 anti-CD74 hLL1 F [figuras 18 (a) a (c)].

Por lo tanto, se encontró que el anticuerpo biespecífico de CD74-HER2 hLL1-4D5/mvG4-4 F preparado basándose en la proteína de andamiaje heterodímero (HSP) compuesta por CH y CH-Fc, es una proteína heterodímera que presenta una actividad de unión divalente.

[Ejemplo 9] Citotoxicidad dependiente del complemento (actividad de CDC) de la proteína heterodímera.

La actividad CDC del anticuerpo monovalente compuesto por dos polipéptidos de cadena H y cadena CL-Fc preparados en el ejemplo 3 se midió según el método descrito en el documento n° WO 2011/108502. El experimento se repitió tres veces. Se utilizó la estirpe celular de linfoma de Burkitt positiva para CD20 ST-486 (ATCC n° CRL-1647) como una célula diana.

Se dispensaron 50 µl de las células diana diluidos en 1.0×10⁶/ml utilizando RPMI1640 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) que contenía FBS al 10% (JRH), 50 µl de la solución de anticuerpo ajustada a 3 veces la concentración final y 50 µl de un complemento humano diluido 2 veces (SIGMA), en cada pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.). Se utilizó hlgG1 como control negativo y anticuerpo anti-CD20 GA101/IgG1 F y anticuerpo desfucosilado anti-CD20 GA101/IgG1 DF como controles positivos.

Además, el pocillo que no contenía anticuerpo se preparó como pocillo de 0% de reacción y el pocillo que no contenía células diana se preparó como pocillo de 100% de reacción. Las células se cultivaron a 37°C (5% de CO₂) durante 2 horas y después se añadieron 15 µl de WST-1 (Roche) a cada pocillo de reacción y se cultivaron a 37°C (5% de CO₂) durante 3 horas.

Tras completar la reacción, se midió la DO450 de cada pocillo y se calculó la citotoxicidad (%) utilizando la ecuación siguiente.

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = 100 \times \{1 - (\text{absorbancia de pocillo de reacción} - \text{absorbancia de pocillo de 100\% de reacción}) / (\text{absorbancia de pocillo de 0\% de reacción} - \text{absorbancia de pocillo de 100\% de reacción})\}$$

La actividad CDC por concentración molar de anticuerpo monovalente de tipo IgG1 anti-CD20 se muestra en la figura 19. Como resultado, el anticuerpo monovalente de tipo IgG1 anti-CD20 GA101/mvG1-2 F y el anticuerpo monovalente defucosilado de tipo IgG1 anti-CD20 mostraban una actividad CDC incrementada en comparación con el anticuerpo anti-CD20 GA101/IgG1 F y GA101/IgG1 DF.

[Ejemplo 10] Control de la actividad de unión de C1q de la proteína heterodímera.

La unión del anticuerpo IgG1, el anticuerpo monovalente y C1q unido al mismo sobre la superficie celular se midieron mediante citometría de flujo. Se utilizó la estirpe celular tumoral positiva para CD20 Raji (JCRB9012) y ST-486 (ATCC n° CRL-1647) como células diana. Las células diana se ajustaron a 4×10⁶/ml utilizando BSA-PBS (NACALAI TESQUE, INC.) y se añadió además suero de ratón diluido 1/20 (CEDARLANE) y se dejaron a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Se dispensaron 50 µl de dicha suspensión celular en cada pocillo de una placa en U de 96 pocillos (FALCON) y se añadieron 50 µl de solución de anticuerpo diluida 3 veces (GA101/IgG1 F, GA101/mvG1-2F, hIgG1) en BSA-PBS y una concentración de 3 veces de C1q purificado (SIGMA, C1740). Se añadió tampón a modo de control negativo.

Se suspendió cada pocillo y se dejó sobre hielo durante 1 hora. A continuación, se desechó el sobrenadante mediante centrifugación. Se añadieron 180 µl de BSA-PBS a cada pocillo y el sobrenadante asimismo se desechó mediante centrifugación. Dicha manipulación se repitió dos veces para el lavado.

Después, se añadieron a cada pocillo 30 µl de anticuerpo anti-IgG-Fc humano marcado con FITC 10 µg/ml (Abcam, ab99763) o anticuerpo anti-C1q marcado con FITC (Dako, F0254), y se dejaron sobre hielo bajo condiciones de sombra durante 30 minutos. Después, se repitió dos veces la manipulación de lavado anteriormente indicada, y se suspendió en 180 µl de BSA-PBS para utilizarla como muestra de medición.

Se determinó la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada muestra de medición mediante citometría de flujo. Se calculó una proporción de IMF del pocillo de muestra respecto al pocillo de control negativo como intensidad relativa de fluorescencia (RFI). Con respecto a la concentración de anticuerpo y el valor de RFI, la cantidad de unión de anticuerpo a células Raji y la cantidad de unión de C1q a células Raji se muestran en las figuras 20(A) y 20(b), respectivamente, y la cantidad de unión de anticuerpo a células ST-486 y la cantidad de unión de C1q a células ST-486 se muestran en las figuras 21A y 21B, respectivamente.

En ambas Raji [figuras 20(a) y (b)] y ST-486 [figura 21(A) y (b)], se incrementó la cantidad de unión de anticuerpo anti-IgG-Fc en el anticuerpo monovalente GA101/mvG1-2 F en comparación con el anticuerpo IgG1 GA101/IgG1 F [figuras 20(a) y 21(a)] y la cantidad de unión del anticuerpo anti-C1q se incrementó en el anticuerpo monovalente GA101/mvG1-2F, en comparación con el anticuerpo IgG1 GA101/IgG1 F [figuras 20(b) y 21(b)].

Por otra parte, ya se ha confirmado que las afinidades del anticuerpo anti-IgG-Fc para GA101/IgG1 F y GA101/mvG1-2F utilizados en el presente experimento eran equivalentes (datos no representados). Estos resultados sugieren que la actividad de unión a antígeno del anticuerpo monovalente de tipo IgG1 anti-CD20 GA101/mvG1-2F era reducida en comparación con la del anticuerpo IgG anti-CD20 GA101/IgG1 F, mientras que la actividad de unión de C1q del anticuerpo monovalente de tipo IgG1 anti-CD20 GA101/mvG1-2F estaba incrementada en comparación con la del anticuerpo IgG anti-CD20 GA101/IgG1 F.

[Ejemplo 11] Preparación de proteína heterodímera de CDC potenciada.

Con el fin de preparar un anticuerpo monovalente de CDC potenciada como proteína heterodímera de CDC potenciada, se preparó de la manera siguiente un vector de expresión de anticuerpo monovalente que incluía una región Fc de CDC potenciada (documento n° WO 2011/108502).

(1) Preparación de vector de cadena H.

La secuencia de aminoácidos de la región Fc de la región constante de la cadena H 1H1 indicada en el ejemplo 1 se sustituyó por la secuencia de aminoácidos de la región Fc de la región constante de CDC elevada representada

por la SEC ID nº 3, indicada en el documento nº WO 2011/108502. Los fragmentos de las regiones CH2 y CH3 del vector de IgG1-CH 1H1 se digirieron con los enzimas de restricción BmgBI y EcoT22I.

De la misma manera, el vector pKTX93/113 F-N392K (documento nº WO 2011/108502) que contiene la región Fc de CDC potenciada se trató con los enzimas de restricción BmgBI y EcoT22I y el fragmento BmgBI-EcoT22I digerido se insertó en el vector IgG1-CH 1H1. En consecuencia, se obtuvo un vector de cadena H de anticuerpo monovalente que incluía la región Fc de CDC potenciada (en adelante abreviado a 'HCVcom').

(2) Preparación de vector de cadena L.

De la misma manera que en (1), la secuencia de aminoácidos de la región Fc de CL-Fc (1L1) indicada en el ejemplo 1 se sustituyó por la secuencia de aminoácidos de la región Fc de la región constante de CDC elevada representada por la SEC ID nº 3, indicada en el documento nº WO 2011/108502, de manera que se obtiene un vector de cadena L de anticuerpo monovalente que incluye Fc de CDC potenciada (en adelante abreviado a 'LCVcom').

(3) Preparación de vector de expresión de anticuerpo monovalente de CDC potenciada.

Se introdujeron HCVcom y LCVcom obtenidos en (1) y (2), anteriormente, en las regiones CH y CL de pKANTEX93/mvG1-2 indicado en la Tabla 3 del ejemplo 1, de la manera siguiente. El sitio Apal presente en el extremo 5' de la región CH1 y el sitio BamHI presente en el extremo 3'-terminal de la región CH3 de HCVcom se cortaron con cada enzima de restricción y se insertaron en el sitio correspondiente de pKANTEX93/mvG1-2 y posteriormente el sitio BsiWI presente en el extremo 5' de la región Ck y el sitio PmaCI presente en el extremo 3' de la región CH3 de LCVcom se cortaron con cada enzima de restricción y se insertaron en el sitio correspondiente.

En consecuencia, se obtuvo un vector de expresión de anticuerpo monovalente que incluía la región Fc de CDC potenciada (en adelante abreviado a 'pKANTEX93/mvCom'). Las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de la cadena H y de la cadena L de pKANTEX93/mvCom preparado se muestran en las figuras 22A y 22B.

Además, con el fin de preparar el anticuerpo anti-CD20 de CDC potenciada GA101, se insertaron los ADN codificantes de las secuencias de aminoácidos (SEC ID nº 36 y nº 38) de GA101-VH y VL en los sitios apropiados del vector pKTX93/113 F-N392K (documento nº WO 2011/108502) a fin de preparar el vector de expresión GA101/IgG1-Com del anticuerpo divalente anti-CD20 de CDC potenciada.

(4) Producción de anticuerpo monovalente de CDC potenciada.

Se llevó a cabo la producción de anticuerpos monovalentes y divalentes de CDC potenciada de la misma manera que en el ejemplo 3, y se introdujo el vector de expresión de anticuerpo monovalente anti-CD20 pKANTEX93/mvG1-2 y vector de expresión de anticuerpo monovalente anti-CD20 de CDC potenciada pKANTEX93/mvCom en células CHO/FUT8KO, y se expresaron los anticuerpos monovalentes que no presentaban α 1,6-fucosa en la cadena de azúcar unida a N, GA101/mvG1-2DF y GA101/mvCom DF o el anticuerpo divalente de GA101/IgG1-com DF.

La purificación de los anticuerpos monovalentes se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 2(2), excepto en que la purificación con proteína A se llevó a cabo utilizando un portador MabSelectSuRe (GE Healthcare) y tampón citrato 0.1 M de pH 3.9 como tampón de elución. Las proteínas purificadas se sometieron a análisis de SDS-PAGE de la misma manera que en el ejemplo 2(3).

Tal como se muestra en la figura 23, los pesos moleculares de tanto la cadena CL-Fc como la cadena H del anticuerpo monovalente eran de aproximadamente 50 kDa, y se observó una única banda en torno a 50 kDa bajo condiciones reductoras, y se identificó bajo condiciones no reductoras una única banda en torno a 100 kDa predicha como el heterodímero compuestos por dos cadenas polipeptídicas de cadena H y cadena CL-Fc. Por lo tanto, se purificaron los anticuerpos monovalentes uniformes GA101/mvG1-2DF y GA101/mvCom DF.

Estos resultados sugieren que no sólo los anticuerpos monovalentes de tipo IgG1 e IgG4, sino asimismo los anticuerpos monovalentes de CDC potenciada que incluyen una pluralidad de sustituciones de residuos de aminoácido en la región constante, pueden purificarse específicamente como proteína heterodímera con proteína A con la adición de las sustituciones de aminoácidos H435Y/Y436F en la cadena CL-Fc.

Es decir, se reveló que resultaba posible preparar una proteína heterodímera que incluía una pluralidad de sustituciones de residuos de aminoácido en el primer polipéptido y/o en el segundo polipéptido.

[Ejemplo 12] Actividad de CDC de proteína heterodímera de CDC potenciada.

La actividad CDC del anticuerpo monovalente compuesto por dos polipéptidos de cadena H y cadena CL-Fc preparados en el ejemplo 11 se midió según el método descrito en el documento nº WO 2011/108502. El

experimento se llevó a cabo tres veces. Se utilizaron células de linfoma humano positivo para CD20 Raji (JCRB9012) y células de leucemia de células B crónica MEC-1 (DSMZ n° ACC-497) como células diana. A continuación en la presente memoria, se midió la actividad de CDC de la misma manera que en el ejemplo 9.

5 Se muestran los resultados en las figuras 24(a) y (b). El anticuerpo monovalente anti-CD20 de CDC potenciada GA101/mvCom DF mostraba una actividad de CDC potenciada, en comparación con el anticuerpo monovalente de tipo IgG1 anti-CD20 GA101/mvG1-2DF. Además, el anticuerpo monovalente anti-CD20 de CDC potenciada GA101/mvCom DF mostraba una actividad de CDC equivalente a la del anticuerpo divalente anti-CD20 de CDC potenciada GA101/IgG1-Com DF en el intervalo de concentraciones elevadas.

10 Por lo tanto, asimismo se reveló que la actividad de CDC del anticuerpo monovalente se incrementaba mediante la pluralidad de sustituciones de residuos de aminoácido de la región constante en el anticuerpo monovalente que es una proteína heterodímera compuesta por cadena H y CL-Fc, al igual que en el anticuerpo IgG divalente.

15 **[Ejemplo 13] Actividad de ADCC de la proteína heterodímera.**

La actividad de ADCC del anticuerpo monovalente anti-CD20 de CDC potenciada GA101/mvCom DF que es la proteína heterodímera de CDC potenciada preparada en el ejemplo 11, se midió de la misma manera que en el ejemplo 7(2). Se utilizaron células de linfoma humano positivo para CD20 Raji (JCRB9012) y células de leucemia de células B crónica MEC-1 (DSMZ n° ACC-497) como células diana.

20 Se utilizó hlgG1 (Millipore, AG-502) como control negativo, anticuerpo monovalente desfucosilado de tipo IgG1 anti-CD20 GA101/mvG1-2DF como control positivo y anticuerpo monovalente fucosilado de tipo IgG1 anti-CD20 GA101/mvG1-2F como control de comparación.

25 Se muestran los resultados en las figuras 25(a) y (b). Se encontró que el anticuerpo monovalente desfucosilado anti-CD20 de CDC potenciada GA101/mvCom DF mostraba una actividad de ADCC elevada, equivalente a la del anticuerpo monovalente desfucosilado de tipo IgG1 anti-CD20 GA101/mvG1-2 DF.

30 La presente solicitud se basa en la solicitud provisional de patente US n° 61/710.221, presentada el 5 de octubre de 2012.

Listado de secuencias

35 SEC ID n° 1- Secuencia de nucleótidos de ADN de IgG1CH humana
SEC ID n° 2- Secuencia de aminoácidos de IgG1CH humana
SEC ID n° 3- Secuencia de nucleótidos de ADN de IgG4CH humana
SEC ID n° 4- Secuencia de aminoácidos de IgG4CH humana
SEC ID n° 5- Secuencia de nucleótidos de ADN de IgG1CH-His humana
40 SEC ID n° 6- Secuencia de aminoácidos de IgG1CH-His humana
SEC ID n° 7- Secuencia de nucleótidos de ADN de IgG4CH-His humana
SEC ID n° 8- Secuencia de aminoácidos de IgG4CH-His humana
SEC ID n° 9- Secuencia de nucleótidos de ADN de 1H0
SEC ID n° 10- Secuencia de aminoácidos de 1H0
45 SEC ID n° 11- Secuencia de nucleótidos de ADN de 1H1
SEC ID n° 12- Secuencia de aminoácidos de 1H1
SEC ID n° 13- Secuencia de nucleótidos de ADN de 4H0
SEC ID n° 14- Secuencia de aminoácidos de 4H0
SEC ID n° 15- Secuencia de nucleótidos de ADN de 4H1
50 SEC ID n° 16- Secuencia de aminoácidos de 4H1
SEC ID n° 17- Secuencia de nucleótidos de ADN de 4H2
SEC ID n° 18- Secuencia de aminoácidos de 4H2
SEC ID n° 19- Secuencia de nucleótidos de ADN de 4H3
SEC ID n° 20- Secuencia de aminoácidos de 4H3
55 SEC ID n° 21- Secuencia de nucleótidos de ADN de 1L0
SEC ID n° 22- Secuencia de aminoácidos de 1L0
SEC ID n° 23- Secuencia de nucleótidos de ADN de 1L1
SEC ID n° 24- Secuencia de aminoácidos de 1L1
SEC ID n° 25- Secuencia de nucleótidos de ADN de 4L0
60 SEC ID n° 26- Secuencia de aminoácidos de 4L0
SEC ID n° 27- Secuencia de nucleótidos de ADN de 4L1
SEC ID n° 28- Secuencia de aminoácidos de 4L1
SEC ID n° 29- Secuencia de nucleótidos de ADN de 4L2
SEC ID n° 30- Secuencia de aminoácidos de 4L2
65 SEC ID n° 31- Secuencia de nucleótidos de ADN de 4L3
SEC ID n° 32- Secuencia de aminoácidos de 4L3

	SEC ID nº 33- Secuencia de nucleótidos de ADN de 4L4
	SEC ID nº 34- Secuencia de aminoácidos de 4L4
	SEC ID nº 35- Secuencia de nucleótidos de ADN de VH GA101
	SEC ID nº 36- Secuencia de aminoácidos de VH GA101
5	SEC ID nº 37- Secuencia de nucleótidos de ADN de VL GA101
	SEC ID nº 38- Secuencia de aminoácidos de VL GA101
	SEC ID nº 39- Secuencia de nucleótidos de ADN de VH 4D5
	SEC ID nº 40- Secuencia de aminoácidos de VH 4D5
	SEC ID nº 41- Secuencia de nucleótidos de ADN de VL 4D5
10	SEC ID nº 42- Secuencia de aminoácidos de VL 4D5
	SEC ID nº 43- Secuencia de nucleótidos de ADN de VH CD74
	SEC ID nº 44- Secuencia de aminoácidos de VH CD74
	SEC ID nº 45- Secuencia de nucleótidos de ADN de VL CD74
	SEC ID nº 46- Secuencia de aminoácidos de VL CD74
15	SEC ID nº 47- Secuencia de nucleótidos de ADN de conector GS
	SEC ID nº 48- Secuencia de aminoácidos de conector GS
	SEC ID nº 49- Secuencia de nucleótidos de ADN de VH 2F2
	SEC ID nº 50- Secuencia de aminoácidos de VH 2F2
	SEC ID nº 51- Secuencia de nucleótidos de ADN de VL 2F2
20	SEC ID nº 52- Secuencia de aminoácidos de VL 2F2
	SEC ID nº 53- Secuencia de nucleótidos de ADN de CD74VL-CL-Fc-2F2scFv
	SEC ID nº 54- Secuencia de aminoácidos de CD74VL-CL-Fc-2F2scFv
	SEC ID nº 55- Secuencia de nucleótidos de ADN de CD74VL-CL-Fc-4D5scFv
	SEC ID nº 56- Secuencia de aminoácidos de CD74VL-CL-Fc-4D5scFv
25	SEC ID nº 57- Secuencia de nucleótidos de ADN de Ck humana
	SEC ID nº 58- Secuencia de aminoácidos de Ck humana

Listado de secuencias

<110> Kyowa Hakko Kirin, Co., Ltd.
 <120> Composición de proteína heterodímera
 5 <130> W514360
 <150> US61/710221
 <151> 2012-10-05
 <160> 58
 <170> PatentIn versión 3.3
 10 <210> 1
 <211> 993
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 15 <221> CDS
 <222> (1)..(993)
 <400> 1
 gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag 48
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac 96
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc 144
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc 192
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc 240
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag 288
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc 336
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca 384
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc 432
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg 480

ES 2 773 107 T3

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	
145 150 155 160	
tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag	528
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	
165 170 175	
gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg	576
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	
180 185 190	
cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac	624
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	
195 200 205	
aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg	672
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	
210 215 220	
cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag	720
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu	
225 230 235 240	
ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat	768
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	
245 250 255	
ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac	816
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	
260 265 270	
aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc	864
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	
275 280 285	
ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac	912
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	
290 295 300	
gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg	960
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr	
305 310 315 320	
cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	993
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
325 330	
<210> 2	
<211> 330	
<212> PRT	
5 <213> Homo sapiens	
<400> 2	
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	

ES 2 773 107 T3

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 Gly Lys
 325 330
 <210> 3

<211> 984
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 5 <221> CDS
 <222> (1)..(984)
 <400> 3

gcc tcc acc aag ggc cca tcc gtc ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc agg	48
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg	
1 5 10 15	
agc acc tcc gag agc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac	96
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	
20 25 30	
ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc	144
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	
35 40 45	
ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc	192
Gly Val His Thr Phe Pro Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	
50 55 60	
ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acg aag acc	240
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr	
65 70 75 80	
tac acc tgc aac gta gat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag	288
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	
85 90 95	
aga gtt gag tcc aaa tat ggt ccc cca tgc cca tca tgc cca gca cct	336
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro	
100 105 110	
gag ttc ctg ggg gga cca tca gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag	384
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	
115 120 125	
gac act ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acc tgc gtg gtg gtg	432
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	
130 135 140	
gac gtg agc cag gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat	480
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp	
145 150 155 160	

ES 2 773 107 T3

```

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc      528
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
      165                                170                                175

aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac      576
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
      180                                185                                190

tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc      624
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
      195                                200                                205

ccg tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga      672
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
      210                                215                                220

gag cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cag gag gag atg acc aag      720
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
      225                                230                                235                                240

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac      768
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
      245                                250                                255

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag      816
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
      260                                265                                270

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc      864
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
      275                                280                                285

agg cta acc gtg gac aag agc agg tgg cag gag ggg aat gtc ttc tca      912
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
      290                                295                                300

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac aca cag aag agc      960
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
      305                                310                                315                                320

ctc tcc ctg tct ctg ggt aaa tga      984
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
      325

<210> 4
<211> 327
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<400> 4
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1      5      10      15

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

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

```

ES 2 773 107 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 Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 5

5 <211> 1011

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: IgG1-CH-His

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1011)
 <400> 5

gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag	48
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys	
1 5 10 15	
agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac	96
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	
20 25 30	
ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc	144
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	
35 40 45	
ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc	192
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	
50 55 60	
ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc	240
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr	
65 70 75 80	
tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag	288
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	
85 90 95	
aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc	336
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys	
100 105 110	
cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca	384
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	
115 120 125	
aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc	432
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	
130 135 140	
gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg	480
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	

10

ES 2 773 107 T3

145	150	155	160	
tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag				528
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	165	170	175	
gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg				576
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	180	185	190	
cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac				624
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	195	200	205	
aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg				672
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	210	215	220	
cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag				720
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu	225	230	235	240
ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat				768
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	245	250	255	
ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac				816
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	260	265	270	
aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc				864
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	275	280	285	
ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac				912
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	290	295	300	
gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg				960
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr	305	310	315	320
cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa cat cac cat cac cat cac				1008
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys His His His His His His	325	330	335	
tga				1011
<210> 6				
<211> 336				
<212> PRT				
5 <213> Artificial				
<220>				
<223> Constructo sintético				
<400> 6				
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys				
1 5 10 15				

10

ES 2 773 107 T3

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

ES 2 773 107 T3

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys His His His His His His
325 330 335

<210> 7

<211> 1002

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: IgG4-CH-His

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1002)

<400> 7

gcc tcc acc aag ggc cca tcc gtc ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc agg 48
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

agc acc tcc gag agc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac 96
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc 144
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc 192
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acg aag acc 240
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

tac acc tgc aac gta gat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag 288
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

aga gtt gag tcc aaa tat ggt ccc cca tgc cca tca tgc cca gca cct 336
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

gag ttc ctg ggg gga cca tca gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag 384
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

ES 2 773 107 T3

gac act ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acc tgc gtg gtg gtg Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 130 135 140	432
gac gtg agc cag gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp 145 150 155 160	480
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 165 170 175	528
aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 180 185 190	576
tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu 195 200 205	624
ccg tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg 210 215 220	672
gag cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cag gag gag atg acc aag Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys 225 230 235 240	720
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 245 250 255	768
atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 260 265 270	816
acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc Thr Thr Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser 275 280 285	864
agg cta acc gtg gac aag agc agg tgg cag gag ggg aat gtc ttc tca Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser 290 295 300	912
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac aca cag aag agc Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser 305 310 315 320	960
ctc tcc ctg tct ctg ggt aaa cat cac cat cac cat cac tga Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys His His His His His His 325 330	1002

<210> 8

<211> 333

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 8

ES 2 773 107 T3

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

ES 2 773 107 T3

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys His His His His His His
325 330

<210> 9

<211> 993

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: 1H0

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(993)

<400> 9

gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag 48
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac 96
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc 144
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc 192
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc 240
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag 288
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc 336
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

ES 2 773 107 T3

cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca	384
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	
115 120 125	
aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc	432
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	
130 135 140	
gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg	480
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	
145 150 155 160	
tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag	528
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	
165 170 175	
gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg	576
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	
180 185 190	
cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac	624
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	
195 200 205	
aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg	672
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	
210 215 220	
cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag	720
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu	
225 230 235 240	
ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat	768
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	
245 250 255	
ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac	816
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	
260 265 270	
aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc	864
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	
275 280 285	
ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac	912
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	
290 295 300	
gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg	960
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr	
305 310 315 320	
cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	993
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
325 330	

<210> 10

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 10

ES 2 773 107 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

ES 2 773 107 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 11

<211> 993

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: 1H1

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(993)

<400> 11

gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc aag 48
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac 96
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc 144
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc 192
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc 240
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag 288
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

ES 2 773 107 T3

aaa gtt gag ccc aaa tct agc gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc	336
Lys Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys	
100 105 110	
cca gca cct gaa ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctg ttc ccc cca	384
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	
115 120 125	
aaa ccc aag gac acc ctg atg atc tcc ccg acc cct gag gtc aca tgc	432
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	
130 135 140	
gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg	480
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	
145 150 155 160	
tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag	528
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	
165 170 175	
gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctg acc gtc ctg	576
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	
180 185 190	
cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac	624
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	
195 200 205	
aaa gcc ctg cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg	672
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	
210 215 220	
cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc ccg gat gag	720
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu	
225 230 235 240	
ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat	768
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	
245 250 255	
ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac	816
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	
260 265 270	
aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc	864
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	
275 280 285	
ctc tac agc aag ctg acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac	912
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	
290 295 300	
gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg	960
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr	
305 310 315 320	
cag aag agc ctg tcc ctg tct ccg ggt aaa tga	993
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
325 330	

<210> 12

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 12

ES 2 773 107 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	Ser	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	

ES 2 773 107 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 13

<211> 984

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: 4H0

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(984)

<400> 13

gcc tcc acc aag ggc cca tcc gtc ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc agg 48
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

agc acc tcc gag agc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac 96
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc 144
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc 192
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acg aag acc 240
Leu Ser Ser Val Val Val Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

ES 2 773 107 T3

tac acc tgc aac gta gat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys 85 90 95	288
aga gtt gag tcc aaa tat ggt ccc cca tgc cca tca tgc cca gca cct Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro 100 105 110	336
gag ttc ctg ggg gga cca tca gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 115 120 125	384
gac act ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acc tgc gtg gtg gtg Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 130 135 140	432
gac gtg agc cag gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp 145 150 155 160	480
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 165 170 175	528
aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 180 185 190	576
tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu 195 200 205	624
ccg tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg 210 215 220	672
gag cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cag gag gag atg acc aag Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys 225 230 235 240	720
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 245 250 255	768
atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 260 265 270	816
acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser 275 280 285	864
agg cta acc gtg gac aag agc agg tgg cag gag ggg aat gtc ttc tca Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser 290 295 300	912
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac aca cag aag agc Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser 305 310 315 320	960
ctc tcc ctg tct ctg ggt aaa tga Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys 325	984

<210> 14

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 14

ES 2 773 107 T3

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

ES 2 773 107 T3

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 15

<211> 984

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: 4H1

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(984)

<400> 15

gcc tcc acc aag ggc cca tcc gtc ttc ccc ctg gcg ccc tcc tcc aag 48
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

agc acc tcc gag agc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac 96
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc 144
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc 192
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acg aag acc Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr 65 70 75 80	240
tac acc tgc aac gta gat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys 85 90 95	288
aga gtt gag tcc aaa tat ggt ccc cca tgc cca tca tgc cca gca cct Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro 100 105 110	336
gag ttc ctg ggg gga cca tca gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 115 120 125	384
gac act ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acc tgc gtg gtg gtg Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 130 135 140	432
gac gtg agc cag gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp 145 150 155 160	480
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 165 170 175	528
aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 180 185 190	576
tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu 195 200 205	624
ccg tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg 210 215 220	672
gag cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cag gag gag atg acc aag Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys 225 230 235 240	720
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 245 250 255	768
atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 260 265 270	816
acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser 275 280 285	864
agg cta acc gtg gac aag agc agg tgg cag gag ggg aat gtc ttc tca Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser 290 295 300	912
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac aca cag aag agc Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser 305 310 315 320	960
ctc tcc ctg tct ctg ggt aaa tga Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys 325	984

<210> 16

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 16

ES 2 773 107 T3

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

ES 2 773 107 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 17

<211> 984

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: 4H2

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(984)

<400> 17

gcc	tcc	acc	aag	ggc	cca	tcc	gtc	ttc	ccc	ctg	gcg	ccc	tcc	tcc	aag	48
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	
1				5				10					15			

agc	acc	tcc	gag	agc	aca	gcc	gcc	ctg	ggc	tgc	ctg	gtc	aag	gac	tac	96
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
			20				25					30				

ttc	ccc	gaa	ccg	gtg	acg	gtg	tcg	tgg	aac	tca	ggc	gcc	ctg	acc	agc	144
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
		35				40						45				

ES 2 773 107 T3

```

ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc      192
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50                               55                               60

ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acg aag acc      240
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65                               70                               75                               80

tac acc tgc aac gta gat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag      288
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85                               90                               95

aga gtt gag tcc aaa tat ggt ccc cca tgc cca ccg tgc cca gca cct      336
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100                              105                              110

gag ttc ctg ggg gga cca tca gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag      384
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115                              120                              125

gac act ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acc tgc gtg gtg gtg      432
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130                              135                              140

gac gtg agc cag gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat      480
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145                              150                              155                              160

ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc      528
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165                              170                              175

aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac      576
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180                              185                              190

tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc      624
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195                              200                              205

ccg tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga      672
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210                              215                              220

gag cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cag gag gag atg acc aag      720
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225                              230                              235                              240

aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac      768
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245                              250                              255

atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag      816
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260                              265                              270

acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc      864
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275                              280                              285

aag cta acc gtg gac aag agc agg tgg cag gag ggg aat gtc ttc tca      912
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290                              295                              300

tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac aca cag aag agc      960
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305                              310                              315                              320

ctc tcc ctg tct ctg ggt aaa tga      984
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

```

<210> 18

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 773 107 T3

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 773 107 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 19

<211> 984

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: 4H3

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(984)

<400> 19

gcc tcc acc aag ggc cca tcc gtc ttc ccc ctg gcg ccc tcc tcc aag 48

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

1

5

10

15

agc acc tcc gag agc aca gcc gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac 96

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20

25

30

ES 2 773 107 T3

ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser 35 40 45	144
ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser 50 55 60	192
ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acg aag acc Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr 65 70 75 80	240
tac acc tgc aac gta gat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys 85 90 95	288
aga gtt gag tcc aaa tat ggt ccc cca tgc cca ccg tgc cca gca cct Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro 100 105 110	336
gag ttc gag ggg gga cca tca gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys 115 120 125	384
gac act ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc acc tgc gtg gtg gtg Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val 130 135 140	432
gac gtg agc cag gaa gac ccc gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp 145 150 155 160	480
ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe 165 170 175	528
aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp 180 185 190	576
tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu 195 200 205	624
ccg tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg 210 215 220	672
gag cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cag gag gag atg acc aag Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys 225 230 235 240	720
aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp 245 250 255	768
atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys 260 265 270	816
acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser 275 280 285	864
aag cta acc gtg gac aag agc agg tgg cag gag ggg aat gtc ttc tca Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser 290 295 300	912
tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac aca cag aag agc Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser 305 310 315 320	960
ctc tcc ctg tct ctg ggt aaa tga Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys 325	984

5
 <210> 20
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 20
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

ES 2 773 107 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 21

<211> 1005

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: 1L0

<220>

<221> CDS

10 <222> (1) .. (1005)

<400> 21

cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

48

ES 2 773 107 T3

cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe 20 25 30	96
tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln 35 40 45	144
tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser 50 55 60	192
acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu 65 70 75 80	240
aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc aca cat cag ggc ctc agc tcg Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser 85 90 95	288
ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt gac aaa act cac aca Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr 100 105 110	336
tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe 115 120 125	384
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro 130 135 140	432
gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val 145 150 155 160	480
aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr 165 170 175	528
aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val 180 185 190	576
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 195 200 205	624
aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser 210 215 220	672
aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro 225 230 235 240	720
tcc ccg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val 245 250 255	768
aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly 260 265 270	816

ES 2 773 107 T3

cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac 864
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 275 280 285

ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg 912
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 290 295 300

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac 960
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 305 310 315 320

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggc aag tag 1005
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 22
 <211> 334
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 <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 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 Asp Lys Thr His Thr
 100 105 110

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

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 130 135 140

ES 2 773 107 T3

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
145 150 155 160

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
165 170 175

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
180 185 190

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

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
210 215 220

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
225 230 235 240

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
245 250 255

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

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
275 280 285

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

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
305 310 315 320

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 23

<211> 1005

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: 1L1

<220>

<221> CDS

10 <222> (1) .. (1005)

<400> 23

ES 2 773 107 T3

cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag	48
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	
1 5 10 15	
cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc	96
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	
20 25 30	
tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa	144
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	
35 40 45	
tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc	192
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	
50 55 60	
acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag	240
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	
65 70 75 80	
aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc aca cat cag ggc ctc agc tcg	288
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser	
85 90 95	
ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag agc gac aaa act cac aca	336
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ser Asp Lys Thr His Thr	
100 105 110	
tgc cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc	384
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe	
115 120 125	
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct	432
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro	
130 135 140	
gag gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc	480
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val	
145 150 155 160	
aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca	528
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr	
165 170 175	
aag ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc	576
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val	
180 185 190	
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc	624
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys	
195 200 205	
aag gtc tcc aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc	672
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser	
210 215 220	
aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca	720
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro	
225 230 235 240	
tcc cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc	768
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val	
245 250 255	

ES 2 773 107 T3

aaa ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg 816
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
260 265 270

cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac 864
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
275 280 285

ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg 912
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
290 295 300

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac 960
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
305 310 315 320

aac cgc ttc acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggc aag tag 1005
Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 24

<211> 334

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<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 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 Ser Asp Lys Thr His Thr
100 105 110

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

10

ES 2 773 107 T3

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

Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 25

<211> 1011

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: 4L0

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1011)

<400> 25

ES 2 773 107 T3

cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag	48
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	
1 5 10 15	
cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc	96
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	
20 25 30	
tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa	144
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	
35 40 45	
tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc	192
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	
50 55 60	
acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag	240
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	
65 70 75 80	
aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc aca cat cag ggc ctc agc tcg	288
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser	
85 90 95	
ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt gag tcc aaa tat ggt	336
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Glu Ser Lys Tyr Gly	
100 105 110	
ccc cca tgc cca tca tgc cca gca cct gag ttc ctg ggg gga cca tca	384
Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser	
115 120 125	
gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag gac act ctc atg atc tcc cgg	432
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg	
130 135 140	
acc cct gag gtc acc tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cag gaa gac ccc	480
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro	
145 150 155 160	
gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat ggc gtg gag gtg cat aat gcc	528
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	
165 170 175	
aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc aac agc acg tac cgt gtg gtc	576
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val	
180 185 190	
agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac	624
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	
195 200 205	
aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc ccg tcc tcc atc gag aaa acc	672
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr	
210 215 220	
atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gag cca cag gtg tac acc ctg	720
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	
225 230 235 240	

ES 2 773 107 T3

ccc cca tcc cag gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc 768
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
245 250 255

ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc 816
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
260 265 270

aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac 864
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
275 280 285

tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc agg cta acc gtg gac aag agc 912
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
290 295 300

agg tgg cag gag ggg aat gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct 960
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
305 310 315 320

ctg cac aac cac tac aca cag aag agc ctc tcc ctg tct ctg ggt aaa 1008
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325 330 335

tag 1011
<210> 26
<211> 336
<212> PRT
5 <213> Artificial
<220>
<223> Constructo sintético
<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 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 Glu Ser Lys Tyr Gly

10

ES 2 773 107 T3

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

<210> 27

<211> 1011

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: 4L1

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1011)

<400> 27

ES 2 773 107 T3

cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag	48
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	
1 5 10 15	
cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc	96
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	
20 25 30	
tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa	144
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	
35 40 45	
tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc	192
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	
50 55 60	
acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag	240
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	
65 70 75 80	
aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc aca cat cag ggc ctc agc tcg	288
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser	
85 90 95	
ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag agt gag tcc aaa tat ggt	336
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ser Glu Ser Lys Tyr Gly	
100 105 110	
ccc cca tgc cca tca tgc cca gca cct gag ttc ctg ggg gga cca tca	384
Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser	
115 120 125	
gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag gac act ctc atg atc tcc cgg	432
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg	
130 135 140	
acc cct gag gtc acc tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cag gaa gac ccc	480
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro	
145 150 155 160	
gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat ggc gtg gag gtg cat aat gcc	528
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	
165 170 175	
aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc aac agc acg tac cgt gtg gtc	576
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val	
180 185 190	
agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac	624
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	
195 200 205	
aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc ccg tcc tcc atc gag aaa acc	672

ES 2 773 107 T3

Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr		
210						215					220						
atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gag	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	720	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu		
225					230				235						240		
ccc	cca	tcc	cag	gag	gag	atg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	768	
Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys		
				245					250					255			
ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tac	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	816	
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser		
			260					265					270				
aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	864	
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp		
		275					280					285					
tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	agg	cta	acc	gtg	gac	aag	agc	912	
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser		
	290					295					300						
agg	tgg	cag	gag	ggg	aat	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	960	
Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala		
305					310				315					320			
ctg	cac	aac	cac	tac	aca	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ctg	ggg	aaa	1008	
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys		
				325					330					335			
tag																1011	
<210>	28																
<211>	336																
<212>	PRT																
<213>	Artificial																
<220>																	
<223>	Constructo sintético																
<400>	28																
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		

ES 2 773 107 T3

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 Ser Glu Ser Lys Tyr Gly
100 105 110

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

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
145 150 155 160

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
165 170 175

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
180 185 190

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

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
210 215 220

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
225 230 235 240

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
245 250 255

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
260 265 270

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
275 280 285

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
290 295 300

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
305 310 315 320

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325 330 335

<210> 29

<211> 1011

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: 4L2

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1011)

<400> 29

ES 2 773 107 T3

cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag	48
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	
1 5 10 15	
cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc	96
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	
20 25 30	
tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa	144
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	
35 40 45	
tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc	192
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	
50 55 60	
acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag	240
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	
65 70 75 80	
aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc aca cat cag ggc ctc agc tcg	288
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser	
85 90 95	
ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag agt gag tcc aaa tat ggt	336
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ser Glu Ser Lys Tyr Gly	
100 105 110	
ccc cca tgc cca tca tgc cca gca cct gag ttc ctg ggg gga cca tca	384
Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser	
115 120 125	
gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag gac act ctc atg atc tcc cgg	432
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg	
130 135 140	
acc cct gag gtc acc tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cag gaa gac ccc	480
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro	
145 150 155 160	
gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat ggc gtg gag gtg cat aat gcc	528
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	
165 170 175	
aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc aac agc acg tac cgt gtg gtc	576
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val	
180 185 190	

ES 2 773 107 T3

agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac 624
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
195 200 205

aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc ccg tcc tcc atc gag aaa acc 672
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
210 215 220

atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gag cca cag gtg tac acc ctg 720
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
225 230 235 240

ccc cca tcc cag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc 768
Pro Pro Ser Gln Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
245 250 255

ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc 816
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
260 265 270

aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac 864
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
275 280 285

tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc agg cta acc gtg gac aag agc 912
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
290 295 300

agg tgg cag gag ggg aat gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct 960
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
305 310 315 320

ctg cac aac cgc ttc aca cag aag agc ctc tcc ctg tct ctg ggt aaa 1008
Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325 330 335

tag 1011

<210> 30

<211> 336

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<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 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

10

ES 2 773 107 T3

50		55		60
Thr 65	Tyr 66	Ser 67	Leu 68	Ser 69
		Ser 70	Thr 71	Leu 72
			Thr 73	Leu 74
			Ser 75	Lys 76
			Ala 77	Asp 78
			Tyr 79	Glu 80
Lys 81	His 82	Lys 83	Val 84	Tyr 85
			Ala 86	Cys 87
			Glu 88	Val 89
			Thr 90	His 91
			Gln 92	Gly 93
			Leu 94	Ser 95
Pro 96	Val 97	Thr 98	Lys 99	Ser 100
			Phe 101	Asn 102
			Arg 103	Gly 104
			Glu 105	Ser 106
			Glu 107	Ser 108
			Lys 109	Tyr 110
			Gly 111	
Pro 112	Pro 113	Cys 114	Pro 115	Ser 116
			Cys 117	Pro 118
			Ala 119	Pro 120
			Pro 121	Glu 122
			Phe 123	Leu 124
			Gly 125	Gly 126
			Pro 127	Ser 128
Val 129	Phe 130	Leu 131	Phe 132	Pro 133
			Pro 134	Lys 135
			Pro 136	Lys 137
			Asp 138	Thr 139
			Leu 140	Met 141
			Ile 142	Ser 143
			Arg 144	
Thr 145	Pro 146	Glu 147	Val 148	Thr 149
			Cys 150	Val 151
			Val 152	Val 153
			Val 154	Asp 155
			Val 156	Ser 157
			Gln 158	Glu 159
			Asp 160	Pro 161
Glu 162	Val 163	Gln 164	Phe 165	Asn 166
			Trp 167	Tyr 168
			Val 169	Asp 170
			Gly 171	Val 172
			Glu 173	Val 174
			His 175	Asn 176
			Ala 177	
Lys 178	Thr 179	Lys 180	Pro 181	Arg 182
			Glu 183	Glu 184
			Gln 185	Phe 186
			Asn 187	Ser 188
			Thr 189	Tyr 190
			Arg 191	Val 192
			Val 193	
Ser 194	Val 195	Leu 196	Thr 197	Val 198
			Leu 199	His 200
			Gln 201	Asp 202
			Trp 203	Leu 204
			Asn 205	Gly 206
			Lys 207	Glu 208
			Tyr 209	
Lys 210	Cys 211	Lys 212	Val 213	Ser 214
			Asn 215	Lys 216
			Gly 217	Leu 218
			Pro 219	Ser 220
			Ser 221	Ile 222
			Glu 223	Lys 224
			Thr 225	Leu 226
Ile 227	Ser 228	Lys 229	Ala 230	Lys 231
			Gly 232	Gln 233
			Pro 234	Arg 235
			Glu 236	Pro 237
			Gln 238	Val 239
			Tyr 240	Thr 241
				Leu 242
Pro 243	Pro 244	Ser 245	Gln 246	Glu 247
			Met 248	Thr 249
			Lys 250	Asn 251
			Gln 252	Val 253
			Ser 254	Leu 255
			Thr 256	Cys 257
Leu 258	Val 259	Lys 260	Gly 261	Phe 262
			Tyr 263	Pro 264
			Ser 265	Asp 266
			Ile 267	Ala 268
			Val 269	Glu 270
			Trp 271	Glu 272
			Ser 273	
Asn 274	Gly 275	Gln 276	Pro 277	Glu 278
			Asn 279	Asn 280
			Tyr 281	Lys 282
			Thr 283	Thr 284
			Pro 285	Pro 286
			Val 287	Leu 288
			Asp 289	Lys 290
			Ser 291	
Ser 292	Asp 293	Gly 294	Ser 295	Phe 296
			Phe 297	Leu 298
			Tyr 299	Ser 300
			Arg 301	Leu 302
			Thr 303	Val 304
			Asp 305	Lys 306
			Ser 307	
Arg 308	Trp 309	Gln 310	Glu 311	Gly 312
			Asn 313	Val 314
			Phe 315	Ser 316
			Cys 317	Ser 318
			Val 319	Met 320
			His 321	Glu 322
			Ala 323	
Leu 324	His 325	Asn 326	Arg 327	Phe 328
			Thr 329	Gln 330
			Lys 331	Ser 332
			Leu 333	Ser 334
			Leu 335	Gly 336
			Lys 337	

<210> 31
 <211> 1011
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: 4L3

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(1011)

<400> 31

cgt	acg	gtg	gct	gca	cca	tct	gtc	ttc	atc	ttc	ccg	cca	tct	gat	gag	48
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	
1				5					10					15		

cag	ttg	aaa	tct	gga	act	gcc	tct	gtt	gtg	tgc	ctg	ctg	aat	aac	ttc	96
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	
			20					25					30			

tat	ccc	aga	gag	gcc	aaa	gta	cag	tgg	aag	gtg	gat	aac	gcc	ctc	caa	144
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	
		35					40					45				

tcg	ggt	aac	tcc	cag	gag	agt	gtc	aca	gag	cag	gac	agc	aag	gac	agc	192
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	
	50					55					60					

acc	tac	agc	ctc	agc	agc	acc	ctg	acg	ctg	agc	aaa	gca	gac	tac	gag	240
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	
65					70					75					80	

aaa	cac	aaa	gtc	tac	gcc	tgc	gaa	gtc	aca	cat	cag	ggc	ctc	agc	tcg	288
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	
			85					90						95		

ccc	gtc	aca	aag	agc	ttc	aac	agg	gga	gag	agt	gag	tcc	aaa	tat	ggt	336
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Ser	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	
			100					105					110			

ccc	cca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	gag	ttc	ctg	ggg	gga	cca	tca	384
Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	
		115					120					125				

gtc	ttc	ctg	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	act	ctc	atg	atc	tcc	cgg	432
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
	130					135					140					

acc	cct	gag	gtc	acc	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cag	gaa	gac	ccc	480
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	
145					150				155						160	

gag	gtc	cag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gat	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	528
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

ES 2 773 107 T3

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	
165 170 175	
aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc aac agc acg tac cgt gtg gtc	576
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val	
180 185 190	
agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac	624
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	
195 200 205	
aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc ccg tcc tcc atc gag aaa acc	672
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr	
210 215 220	
atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gag cca cag gtg tac acc ctg	720
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	
225 230 235 240	
ccc cca tcc cag gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc	768
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	
245 250 255	
ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc	816
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	
260 265 270	
aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac	864
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	
275 280 285	
tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag cta acc gtg gac aag agc	912
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	
290 295 300	
agg tgg cag gag ggg aat gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct	960
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala	
305 310 315 320	
ctg cac aac cgc ttc aca cag aag agc ctc tcc ctg tct ctg ggt aaa	1008
Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys	
325 330 335	
tag	1011
<210> 32	
<211> 336	
<212> PRT	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Constructo sintético	
<400> 32	
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	

5

10

ES 2 773 107 T3

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 Ser Glu Ser Lys Tyr Gly
 100 105 110
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 130 135 140
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 145 150 155 160
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 165 170 175
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 180 185 190
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 195 200 205
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 210 215 220
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 225 230 235 240
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 245 250 255
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 260 265 270
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 275 280 285
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 290 295 300
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 305 310 315 320
 Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325 330 335
 <210> 33

<211> 1011
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: 4L4

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1011)
 <400> 33

cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag	48
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	
1 5 10 15	
 cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc	96
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	
20 25 30	
 tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa	144
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	
35 40 45	
 tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc	192
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	
50 55 60	
 acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag	240
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	
65 70 75 80	
 aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc aca cat cag ggc ctc agc tcg	288
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser	
85 90 95	
 ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag agt gag tcc aaa tat ggt	336
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ser Glu Ser Lys Tyr Gly	
100 105 110	
 ccc cca tgc cca ccg tgc cca gca cct gag ttc gag ggg gga cca tca	384
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser	
115 120 125	
 gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag gac act ctc atg atc tcc cgg	432
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg	
130 135 140	

10

ES 2 773 107 T3

acc cct gag gtc acc tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cag gaa gac ccc	480
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro	
145 150 155 160	
 gag gtc cag ttc aac tgg tac gtg gat ggc gtg gag gtg cat aat gcc	528
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	
165 170 175	
 aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc aac agc acg tac cgt gtg gtc	576
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val	
180 185 190	
 agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac	624
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	
195 200 205	
 aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc ccg tcc tcc atc gag aaa acc	672
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr	
210 215 220	
 atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gag cca cag gtg tac acc ctg	720
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	
225 230 235 240	
 ccc cca tcc cag gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc	768
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	
245 250 255	
 ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc	816
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	
260 265 270	
 aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac	864
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	
275 280 285	
 tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag cta acc gtg gac aag agc	912
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	
290 295 300	
 agg tgg cag gag ggg aat gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct	960
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala	
305 310 315 320	
 ctg cac aac cgc ttc aca cag aag agc ctc tcc ctg tct ctg ggt aaa	1008
Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys	
325 330 335	
 tag	1011
<210> 34	
<211> 336	
<212> PRT	
5 <213> Artificial	
<220>	
<223> Constructo sintético	
<400> 34	
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	

ES 2 773 107 T3

1		5		10		15
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala
		20				
				Ser	Val	Val
				25		
					Cys	Leu
						Leu
						Asn
						Asn
						Phe
						30
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val
		35				
						Gln
						40
						Trp
						Lys
						Val
						Asp
						Asn
						Ala
						Leu
						Gln
						45
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser
	50					
						55
						Val
						Thr
						Glu
						Gln
						Asp
						Ser
						Lys
						Asp
						Ser
						60
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr
						Leu
						Thr
						Leu
						Ser
						Lys
						Ala
						Asp
						Tyr
						Glu
						80
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys
						Glu
						Val
						Thr
						His
						Gln
						Gly
						Leu
						Ser
						Ser
						95
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn
						Arg
						Gly
						Glu
						Ser
						Glu
						Ser
						Lys
						Tyr
						Gly
						110
Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
						Ala
						Pro
						Glu
						Phe
						Glu
						Gly
						Gly
						Pro
						Ser
						125
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
						Pro
						Lys
						Asp
						Thr
						Leu
						Met
						Ile
						Ser
						Arg
						140
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
						Val
						Val
						Val
						Asp
						Val
						Ser
						Gln
						Glu
						Asp
						Pro
						160
Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr
						Val
						Asp
						Gly
						Val
						Glu
						Val
						His
						Asn
						Ala
						175
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
						Gln
						Phe
						Asn
						Ser
						Thr
						Tyr
						Arg
						Val
						Val
						190
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
						Gln
						Asp
						Trp
						Leu
						Asn
						Gly
						Lys
						Glu
						Tyr
						205
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
						Gly
						Leu
						Pro
						Ser
						Ser
						Ile
						Glu
						Lys
						Thr
						220
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
						Pro
						Arg
						Glu
						Pro
						Gln
						Val
						Tyr
						Thr
						Leu
						240
Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met
						Thr
						Lys
						Asn
						Gln
						Val
						Ser
						Leu
						Thr
						Cys
						255

ES 2 773 107 T3

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
260 265 270

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
275 280 285

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
290 295 300

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
305 310 315 320

Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325 330 335

<210> 35

<211> 357

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: CD20VH

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(357)

<400> 35

cag gtg caa ttg gtg cag tct ggc gct gaa gtt aag aag cct ggg agt 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

tca gtg aag gtc tcc tgc aag gct tcc gga tac gcc ttc agc tat tct 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

tgg atg aac tgg gtg cgg cag gcc cct gga caa ggg ctc gag tgg atg 144
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

gga cgg atc ttt ccc ggc gat ggg gat act gac tac aat ggg aaa ttc 192
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

aag ggc aga gtc aca att acc gcc gac aaa tcc act agc aca gcc tat 240
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

atg gag ctg agc agc ctg aga tcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gca aga aat gtc ttt gat ggt tac tgg ctt gtt tac tgg ggc cag gga 336
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

acc ctg gtc acc gtc tcc tca 357

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 36

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Constructo sintético

<400> 36

ES 2 773 107 T3

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

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

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 37

<211> 336

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: CD20VL

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(336)

<400> 37

gat atc gtg atg acc cag act cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

gag ccc gcc agc att agc tgc agg tct agc aag agc ctc ttg cac agc 96
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

aat ggc atc act tat ttg tat tgg tac ctg caa aag cca ggg cag tct 144
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

cca cag ctc ctg att tat caa atg tcc aac ctt gtc tct ggc gtc cct 192
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
50 55 60

gac cgg ttc tcc ggc tcc ggg tca ggc act gat ttc aca ctg aaa atc 240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

agc agg gtg gag gct gag gat gtt gga gtt tat tac tgc gct cag aat 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
85 90 95

cta gaa ctt cct tac acc ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 336
Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

15 <210> 38

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 38

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val 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 Ala Gln Asn
85 90 95

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

5 <210> 39

<211> 360

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: HER2VH

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<400> 39

gag gtt cag ctg gtg gag tct ggc ggt ggc ctg gtg cag cca ggg ggc 48

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

tca ctc cgt ttg tcc tgt gca gct tct ggc ttc aac att aaa gac acc 96

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

tat ata cac tgg gtg cgt cag gcc ccg ggt aag ggc ctg gaa tgg gtt 144

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca agg att tat cct acg aat ggt tat act aga tat gcc gat agc gtc 192

Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cgt ttc act ata agc gca gac aca tcc aaa aac aca gcc tac 240

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

ctg cag atg aac agc ctg cgt gct gag gac act gcc gtc tat tat tgt 288

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

tct aga tgg gga ggg gac ggc ttc tat gct atg gac tac tgg ggt caa 336

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

gga acc ctg gtc acc gtc tcc tct 360

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 40

	<211> 120	
	<212> PRT	
	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> Constructo sintético	
	<400> 40	
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
	1 5 10 15	
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr	
	20 25 30	
	Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
	35 40 45	
	Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val	
	50 55 60	
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr	
	65 70 75 80	
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
	85 90 95	
	Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln	
	100 105 110	
	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
	115 120	
10	<210> 41	
	<211> 321	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de secuencia artificial: HER2VL	
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(321)	
	<400> 41	
	gat atc cag atg acc cag tcc ccg agc tcc ctg tcc gcc tct gtg ggc	48
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
	1 5 10 15	
	gat agg gtc acc atc acc tgc cgt gcc agt cag gat gtg aat act gct	96
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala	
	20 25 30	
	gta gcc tgg tat caa cag aaa cca gga aaa gct ccg aaa cta ctg att	144
	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
	35 40 45	
	tac tcg gca tcc ttc ctc tac tct gga gtc cct tct cgc ttc tct gga	192
	Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
	50 55 60	
	tcc aga tct ggg acg gat ttc act ctg acc atc agc agt ctg cag ccg	240
	Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
	65 70 75 80	
20	gaa gac ttc gca act tat tac tgt cag caa cat tat act act cct ccc	288
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro	

ES 2 773 107 T3

	85	90	95	
	acg ttc gga cag ggt acc aag gtg gag atc aaa			321
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105		
	<210> 42			
	<211> 107			
	<212> PRT			
5	<213> Artificial			
	<220>			
	<223> Constructo sintético			
	<400> 42			
	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 Val Asn Thr Ala			
	20	25	30	
	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
	35	40	45	
	Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
	50	55	60	
	Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
	65	70	75	80
	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro			
	85	90	95	
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105		
10	<210> 43			
	<211> 360			
	<212> ADN			
	<213> Artificial			
	<220>			
15	<223> Descripción de secuencia artificial: CD74VH			
	<220>			
	<221> CDS			
	<222> (1)..(360)			
	<400> 43			
	cag gtc caa ctg cag caa tct ggg tct gag ttg aag aag cct ggg gcc			48
	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala			
20	1	5	10	15

tca gtg aag gtt tcc tgc aag gct tct gga tac acc ttc act aac tat 96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

gga gtg aac tgg ata aag cag gcc cct gga caa ggg ctt cag tgg atg 144
Gly Val Asn Trp Ile Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met
35 40 45

ggc tgg ata aac ccc aac act gga gag cca aca ttt gat gat gac ttc 192
Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Phe Asp Asp Asp Phe
50 55 60

aag gga cga ttt gcc ttc tcc ttg gac acc tct gtc agc acg gca tat 240
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

ctc cag atc agc agc cta aag gct gac gac act gcc gtg tat ttc tgt 288
Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

tca aga tcg agg ggt aaa aac gaa gcc tgg ttt gct tat tgg ggc caa 336
Ser Arg Ser Arg Gly Lys Asn Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

ggg acc ctg gtc acc gtc tcc tca 360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 44

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 44

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Phe Asp Asp Asp Phe
50 55 60

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

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

10 Ser Arg Ser Arg Gly Lys Asn Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 45

<211> 336

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: CD74VL

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(336)

<400> 45

gac atc cag ctg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc ctt gga 48
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

cag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tca agt cag agc ctt gta cac aga 96
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
20 25 30

aat gga aac acc tat tta cat tgg ttt cag cag agg cca ggc caa tct 144
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

cca agg ctc ctg atc tac aca gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca 192
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

gac aga ttc agc ggc agt ggg tca ggc act gat ttc aca ctg aaa atc 240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

agc agg gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat ttc tgc tct caa agt 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

tca cat gtt cct ccc acg ttc ggt gct ggg aca cga ctg gag atc aaa 336
Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 46

5 <211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

10 <400> 46

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

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

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

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Thr 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 Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 47

15 <211> 45

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: conector GS

20 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(45)

<400> 47
 tcc ggc gga ggg ggt tcc gga gga ggg ggt tcc ggc gga ggg ggt 45
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15
 <210> 48
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 48
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 10 1 5 10 15
 <210> 49
 <211> 366
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: CD20-2F2-VH
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(366)
 20 <400> 49
 gaa gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggc agg 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt aat gat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30

 gcc atg cac tgg gtc cgg caa gct cca ggg aag ggc ctg gag tgg gtc 144
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 tca act att agt tgg aat agt ggt tcc ata ggc tat gcg gac tct gtg 192
 Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

 aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aag tcc ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

 ctg caa atg aac agt ctg aga gct gag gac acg gcc ttg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 gca aaa gat ata cag tac ggc aac tac tac tac ggt atg gac gtc tgg 336
 Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
 100 105 110

 ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 366
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 50
 <211> 122
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 50

ES 2 773 107 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51

<211> 321

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: CD20-2F2-VL

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 51

gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct gcc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act gcc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg ccg atc 288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
85 90 95

acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 52

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 52

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

5 <210> 53

<211> 2121

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: CD74VL-CL-Fc-2F2scFv

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2121)

<400> 53

gac atc cag ctg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc ctt gga 48

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

cag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tca agt cag agc ctt gta cac aga 96

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

15 aat gga aac acc tat tta cat tgg ttt cag cag agg cca ggc caa tct 144

ES 2 773 107 T3

Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	His	Trp	Phe	Gln	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Ser		
	35						40					45					
cca	agg	ctc	ctg	atc	tac	aca	gtt	tcc	aac	cga	ttt	tct	ggg	gtc	cca	192	
Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Thr	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro		
	50					55					60						
gac	aga	ttc	agc	ggc	agt	ggg	tca	ggc	act	gat	ttc	aca	ctg	aaa	atc	240	
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile		
	65				70				75					80			
agc	agg	gtg	gag	gct	gag	gat	gtt	ggg	gtt	tat	ttc	tgc	tct	caa	agt	288	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ser	Gln	Ser		
			85					90					95				
tca	cat	gtt	cct	ccc	acg	ttc	ggt	gct	ggg	aca	cga	ctg	gag	atc	aaa	336	
Ser	His	Val	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Arg	Leu	Glu	Ile	Lys		
			100					105					110				
cgt	acg	gtg	gct	gca	cca	tct	gtc	ttc	atc	ttc	ccg	cca	tct	gat	gag	384	
Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu		
		115					120					125					
cag	ttg	aaa	tct	gga	act	gcc	tct	gtt	gtg	tgc	ctg	ctg	aat	aac	ttc	432	
Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe		
	130					135					140						
tat	ccc	aga	gag	gcc	aaa	gta	cag	tgg	aag	gtg	gat	aac	gcc	ctc	caa	480	
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln		
	145				150				155					160			
tcg	ggt	aac	tcc	cag	gag	agt	gtc	aca	gag	cag	gac	agc	aag	gac	agc	528	
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser		
			165					170					175				
acc	tac	agc	ctc	agc	agc	acc	ctg	acg	ctg	agc	aaa	gca	gac	tac	gag	576	
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu		
			180					185					190				
aaa	cac	aaa	gtc	tac	gcc	tgc	gaa	gtc	aca	cat	cag	ggc	ctc	agc	tcg	624	
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser		
		195				200						205					
ccc	gtc	aca	aag	agc	ttc	aac	agg	gga	gag	agt	gag	tcc	aaa	tat	ggt	672	
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Ser	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly		
	210					215					220						
ccc	cca	tgc	cca	ccg	tgc	cca	gca	cct	gag	ttc	ctg	ggg	gga	cca	tca	720	
Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser		
	225				230				235					240			
gtc	ttc	ctg	ttc	ccc	cca	aaa	ccc	aag	gac	act	ctc	atg	atc	tcc	cgg	768	
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg		
			245					250					255				
acc	cct	gag	gtc	acc	tgc	gtg	gtg	gtg	gac	gtg	agc	cag	gaa	gac	ccc	816	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro		
		260					265					270					
gag	gtc	cag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gat	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	864	
Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala		
	275					280						285					

ES 2 773 107 T3

aag aca aag ccg cgg gag gag cag ttc aac agc acg tac cgt gtg gtc Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val 290 295 300	912
agc gtc ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr 305 310 315 320	960
aag tgc aag gtc tcc aac aaa ggc ctc ccg tcc tcc atc gag aaa acc Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr 325 330 335	1008
atc tcc aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gag cca cag gtg tac acc ctg Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu 340 345 350	1056
ccc cca tcc cag gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys 355 360 365	1104
ctg gtc aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser 370 375 380	1152
aat ggg cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp 385 390 395 400	1200
tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc tac agc aag cta acc gtg gac aag agc Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser 405 410 415	1248
agg tgg cag gag ggg aat gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala 420 425 430	1296
ctg cac aac cgc ttc aca cag aag agc ctc tcc ctg tct ctg ggt aaa Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys 435 440 445	1344
tcc ggc gga ggg ggt tcc gga gga ggg ggt tcc ggc gga ggg ggt gaa Ser Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu 450 455 460	1392
gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggc agg tcc Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser 465 470 475 480	1440
ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttt aat gat tat gcc Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr Ala 485 490 495	1488
atg cac tgg gtc ccg caa gct cca ggg aag ggc ctg gag tgg gtc tca Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser 500 505 510	1536
act att agt tgg aat agt ggt tcc ata ggc tat gcg gac tct gtg aag Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys 515 520 525	1584
ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aag tcc ctg tat ctg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr Leu 530 535 540	1632

ES 2 773 107 T3

caa atg aac agt ctg aga gct gag gac acg gcc ttg tat tac tgt gca	1680
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala	
545 550 555 560	
aaa gat ata cag tac gcc aac tac tac tac ggt atg gac gtc tgg gcc	1728
Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly	
565 570 575	
caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca ggt ggt gga ggt agt gga ggt	1776
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
580 585 590	
ggt gga tct ggt gga ggt gga agt gaa att gtg ttg aca cag tct cca	1824
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro	
595 600 605	
gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg	1872
Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg	
610 615 620	
gcc agt cag agt gtt agc agc tac tta gcc tgg tac caa cag aaa cct	1920
Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro	
625 630 635 640	
ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act	1968
Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr	
645 650 655	
ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act	2016
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
660 665 670	
ctc acc atc agc agc cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt	2064
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys	
675 680 685	
cag cag cgt agc aac tgg ccg atc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg	2112
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu	
690 695 700	
gag att aaa	2121
Glu Ile Lys	
705	
<210> 54	
<211> 707	
<212> PRT	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Constructo sintético	
<400> 54	
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly	
1 5 10 15	
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg	
20 25 30	

5

10

ES 2 773 107 T3

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

ES 2 773 107 T3

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu
 450 455 460
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Ser
 465 470 475 480
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr Ala
 485 490 495
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 500 505 510
 Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 515 520 525
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Ser Leu Tyr Leu

ES 2 773 107 T3

530

535

540

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala
545 550 555 560

Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
565 570 575

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
580 585 590

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
595 600 605

Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg
610 615 620

Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
625 630 635 640

Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
645 650 655

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
660 665 670

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
675 680 685

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu
690 695 700

Glu Ile Lys

705

<210> 55

<211> 2115

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: CD74VL-CL-Fc-4D5scFv

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(2115)

<400> 55

gac atc cag ctg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc ctt gga
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly

48

ES 2 773 107 T3

1	5	10	15	
cag ccg gcc tcc atc tcc tgc aga tca agt cag agc ctt gta cac aga				96
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg	20	25	30	
aat gga aac acc tat tta cat tgg ttt cag cag agg cca ggc caa tct				144
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser	35	40	45	
cca agg ctc ctg atc tac aca gtt tcc aac cga ttt tct ggg gtc cca				192
Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ser Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro	50	55	60	
gac aga ttc agc ggc agt ggg tca ggc act gat ttc aca ctg aaa atc				240
Asp Arg Phe Ser Gly Ala Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile	65	70	75	80
agc agg gtg gag gct gag gat gtt ggg gtt tat ttc tgc tct caa agt				288
Ser Arg Val Glu Pro Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser	85	90	95	
tca cat gtt cct ccc acg ttc ggt gct ggg aca cga ctg gag atc aaa				336
Ser His Val Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys	100	105	110	
cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag				384
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	115	120	125	
cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc				432
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	130	135	140	
tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa				480
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	145	150	155	160
tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc				528
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	165	170	175	
acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag				576
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	180	185	190	
aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc aca cat cag ggc ctc agc tcg				624
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser	195	200	205	
ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag agt gag tcc aaa tat ggt				672
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ser Glu Ser Lys Tyr Gly	210	215	220	
ccc cca tgc cca ccg tgc cca gca cct gag ttc ctg ggg gga cca tca				720
Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser	225	230	235	240
gtc ttc ctg ttc ccc cca aaa ccc aag gac act ctc atg atc tcc cgg				768
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg	245	250	255	
acc cct gag gtc acc tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cag gaa gac ccc				816

ES 2 773 107 T3

Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	
			260					265					270			
gag	gtc	cag	ttc	aac	tgg	tac	gtg	gat	ggc	gtg	gag	gtg	cat	aat	gcc	864
Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
		275					280					285				
aag	aca	aag	ccg	cgg	gag	gag	cag	ttc	aac	agc	acg	tac	cgt	gtg	gtc	912
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
	290					295					300					
agc	gtc	ctc	acc	gtc	ctg	cac	cag	gac	tgg	ctg	aac	ggc	aag	gag	tac	960
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
305					310					315					320	
aag	tgc	aag	gtc	tcc	aac	aaa	ggc	ctc	ccg	tcc	tcc	atc	gag	aaa	acc	1008
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	
				325					330					335		
atc	tcc	aaa	gcc	aaa	ggg	cag	ccc	cga	gag	cca	cag	gtg	tac	acc	ctg	1056
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	
			340				345						350			
ccc	cca	tcc	cag	gag	gag	atg	acc	aag	aac	cag	gtc	agc	ctg	acc	tgc	1104
Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	
		355					360					365				
ctg	gtc	aaa	ggc	ttc	tac	ccc	agc	gac	atc	gcc	gtg	gag	tgg	gag	agc	1152
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
	370					375					380					
aat	ggg	cag	ccg	gag	aac	aac	tac	aag	acc	acg	cct	ccc	gtg	ctg	gac	1200
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
385					390					395					400	
tcc	gac	ggc	tcc	ttc	ttc	ctc	tac	agc	aag	cta	acc	gtg	gac	aag	agc	1248
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
				405					410					415		
agg	tgg	cag	gag	ggg	aat	gtc	ttc	tca	tgc	tcc	gtg	atg	cat	gag	gct	1296
Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	
		420					425					430				
ctg	cac	aac	cgc	ttc	aca	cag	aag	agc	ctc	tcc	ctg	tct	ctg	ggt	aaa	1344
Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	
		435					440					445				
tcc	ggc	gga	ggg	ggt	tcc	gga	gga	ggg	ggt	tcc	ggc	gga	ggg	ggt	gag	1392
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	
	450					455					460					
gtt	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggc	ggt	ggc	ctg	gtg	cag	cca	ggg	ggc	tca	1440
Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	
465					470				475						480	
ctc	cgt	ttg	tcc	tgt	gca	gct	tct	ggc	ttc	aac	att	aaa	gac	acc	tat	1488
Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Tyr	
				485					490					495		
ata	cac	tgg	gtg	cgt	cag	gcc	ccg	ggt	aag	ggc	ctg	gaa	tgg	gtt	gca	1536
Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	
		500						505					510			

ES 2 773 107 T3

agg att tat cct acg aat ggt tat act aga tat gcc gat agc gtc aag	1584
Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys	
515 520 525	
ggc cgt ttc act ata agc gca gac aca tcc aaa aac aca gcc tac ctg	1632
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu	
530 535 540	
cag atg aac agc ctg cgt gct gag gac act gcc gtc tat tat tgt tct	1680
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser	
545 550 555 560	
aga tgg gga ggg gac ggc ttc tat gct atg gac tac tgg ggt caa gga	1728
Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	
565 570 575	
acc ctg gtc acc gtc tcc tcg ggt ggt gga ggt agt gga ggt ggt gga	1776
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly	
580 585 590	
tct ggt gga ggt gga agt gat atc cag atg acc cag tcc ccg agc tcc	1824
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser	
595 600 605	
ctg tcc gcc tct gtg ggc gat agg gtc acc atc acc tgc cgt gcc agt	1872
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser	
610 615 620	
cag gat gtg aat act gct gta gcc tgg tat caa cag aaa cca gga aaa	1920
Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys	
625 630 635 640	
gct ccg aaa cta ctg att tac tcg gca tcc ttc ctc tac tct gga gtc	1968
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val	
645 650 655	
cct tct cgc ttc tct gga tct aga tcc ggg acg gat ttc act ctg acc	2016
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr	
660 665 670	
atc agc agt ctg cag ccg gaa gac ttc gca act tat tac tgt cag caa	2064
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln	
675 680 685	
cat tat act act cct ccc acg ttc gga cag ggt acc aag gtg gag atc	2112
His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile	
690 695 700	
aaa	2115
Lys	
705	
<210> 56	
<211> 705	
<212> PRT	
<213> Artificial	
<220>	
<223> Constructo sintético	
<400> 56	

ES 2 773 107 T3

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Thr 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 Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Ser Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

ES 2 773 107 T3

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu
 450 455 460
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 465 470 475 480
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr
 485 490 495
 Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 500 505 510

ES 2 773 107 T3

Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
515 520 525

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
530 535 540

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
545 550 555 560

Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
565 570 575

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
580 585 590

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
595 600 605

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
610 615 620

Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
625 630 635 640

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val
645 650 655

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
660 665 670

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
675 680 685

His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
690 695 700

Lys

705

<210> 57

<211> 321

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: IgG-k humana

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(321)

<400> 57

ES 2 773 107 T3

cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag 48
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc 96
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa 144
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc 192
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag 240
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc aca cat cag ggc ctc agc tcg 288
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 321
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 58

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

10 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

REIVINDICACIONES

1. Proteína heterodímera que está compuesta por un primer polipéptido que comprende una región constante (en adelante, abreviado a CH) de cadena pesada de inmunoglobulina (en adelante, abreviado a cadena H) y un segundo polipéptido que comprende una secuencia de región constante (en adelante, se hace referencia como CL-Fc) preparada mediante fusión de una región constante de cadena ligera (en adelante, abreviado a cadena L) de inmunoglobulina (en adelante, abreviado a CL) y una región Fc, y presenta asimismo una eliminación o sustitución de residuos de Cys implicados en enlaces disulfuro entre las moléculas de cadena L-cadena H en el anticuerpo IgG, y
 en la que el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una actividad de unión reducida a un ligante de CH,
 en la que el ligante de CH es proteína A,
 en la que el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una eliminación o sustitución de por lo menos un residuo de aminoácido seleccionado de entre las posiciones 253, 310, 433, 435 y 436 de la numeración de índice EU como en Kabat et al. (en adelante, se hace referencia como índice EU).
2. Proteína heterodímera según la reivindicación 1, en la que el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 214 del índice EU con Ser.
3. Proteína heterodímera según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que el primer polipéptido es un polipéptido que incluye un dominio CH1, dominio bisagra, dominio CH2 y dominio CH3, y el segundo polipéptido es un polipéptido que incluye dominio CL, dominio bisagra, dominio CH2 y dominio CH3.
4. Proteína heterodímera según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la subclase de inmunoglobulina es cualquier subclase seleccionada de entre IgG1, IgG2 e IgG4.
5. Proteína heterodímera según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 435 del índice EU con Arg.
6. Proteína heterodímera según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la subclase de inmunoglobulina es IgG4, en la que opcionalmente el primer polipéptido es un polipéptido que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 131 del índice EU con Ser, en la que opcionalmente además el primer polipéptido y el segundo polipéptido son polipéptidos que presentan por lo menos una sustitución seleccionada de entre
 - a) una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 228 del índice EU con Pro,
 - b) una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 409 del índice EU con Lis, o
 - c) una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 235 del índice EU con Glu.
7. Proteína heterodímera según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la subclase de inmunoglobulina es IgG1 y en la que opcionalmente el primer polipéptido es un polipéptido que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 220 del índice EU con Ser.
8. Proteína heterodímera según la reivindicación 7, en la que el segundo polipéptido es un polipéptido que incluye un dominio bisagra que presenta una eliminación de los residuos de aminoácido en las posiciones 216 a 220 del índice EU o un polipéptido que presenta una sustitución del residuo de aminoácido en la posición 220 del índice EU con Ser y en la que opcionalmente la cadena de azúcar sin fucosa unida a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar de entre las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido totales que se unen a la región Fc incluida en la proteína heterodímera es 20% o más,
 y/o en la que opcionalmente el primer polipéptido y/o el segundo polipéptido son polipéptidos que presentan una o más sustituciones de residuos de aminoácido seleccionadas de entre P247I, F243L, R292P, Y300L, Y300F, P396L, T393A, H433P, S239D, S298A, A330L, I332E, E333A, K334A, L235E, P238A, N297A, K322A, P331S, K326A, S267E, H268F, S324T, K274Q, N276K, Y296F, K326W, K326Y, E333A, E333S, A339T, A339D, D356E, L358M, N384S, K392N, T394F, T394Y, V397M y V422I.
9. Proteína heterodímera según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el primer polipéptido y/o el segundo polipéptido son polipéptidos que presentan una o más proteínas de unión unidas al extremo N y/o al extremo C de CH y CL-Fc, en la que opcionalmente la proteína de unión es cualquiera seleccionada de entre regiones variables de anticuerpo, Fv de cadena única (scFv), dominios variables únicos (VHH), proteínas ligandos y proteínas receptoras.
10. Proteína heterodímera según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, seleccionada de entre
 - (i) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido es un polipéptido que presenta una región

variable de cadena pesada de inmunoglobulina (en adelante, se hace referencia como VH) unida en el extremo N de CH, y el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina (en adelante, se hace referencia como VL) unida en el extremo N de CL-Fc, y

5 (ii) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido es un polipéptido que presenta una VL unida en el extremo N de CH, y el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una VH unida en el extremo N de CL-Fc,

10 (iii) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido es un polipéptido que presenta una VH unida en el extremo C de CH, y el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una VL unida en el extremo C de CL-Fc,

15 (iv) una proteína heterodímera, en la que el primer polipéptido es un polipéptido que presenta una VL unida en el extremo C de CH, y el segundo polipéptido es un polipéptido que presenta una VH unida en el extremo C de CL-Fc.

20 11. Proteína heterodímera según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la proteína heterodímera es un anticuerpo seleccionado de entre un anticuerpo monovalente, un anticuerpo divalente, un anticuerpo trivalente y un anticuerpo tetravalente.

12. ADN que codifica la proteína heterodímera según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

25 13. Célula que expresa una proteína heterodímera, que comprende un vector de expresión de proteína que incluye el ADN según la reivindicación 12.

14. Método para preparar una proteína heterodímera, que comprende los procedimientos de cultivar las células que expresan la proteína heterodímera según la reivindicación 13 y purificar la proteína heterodímera a partir del sobrenadante de cultivo.

Fig.1

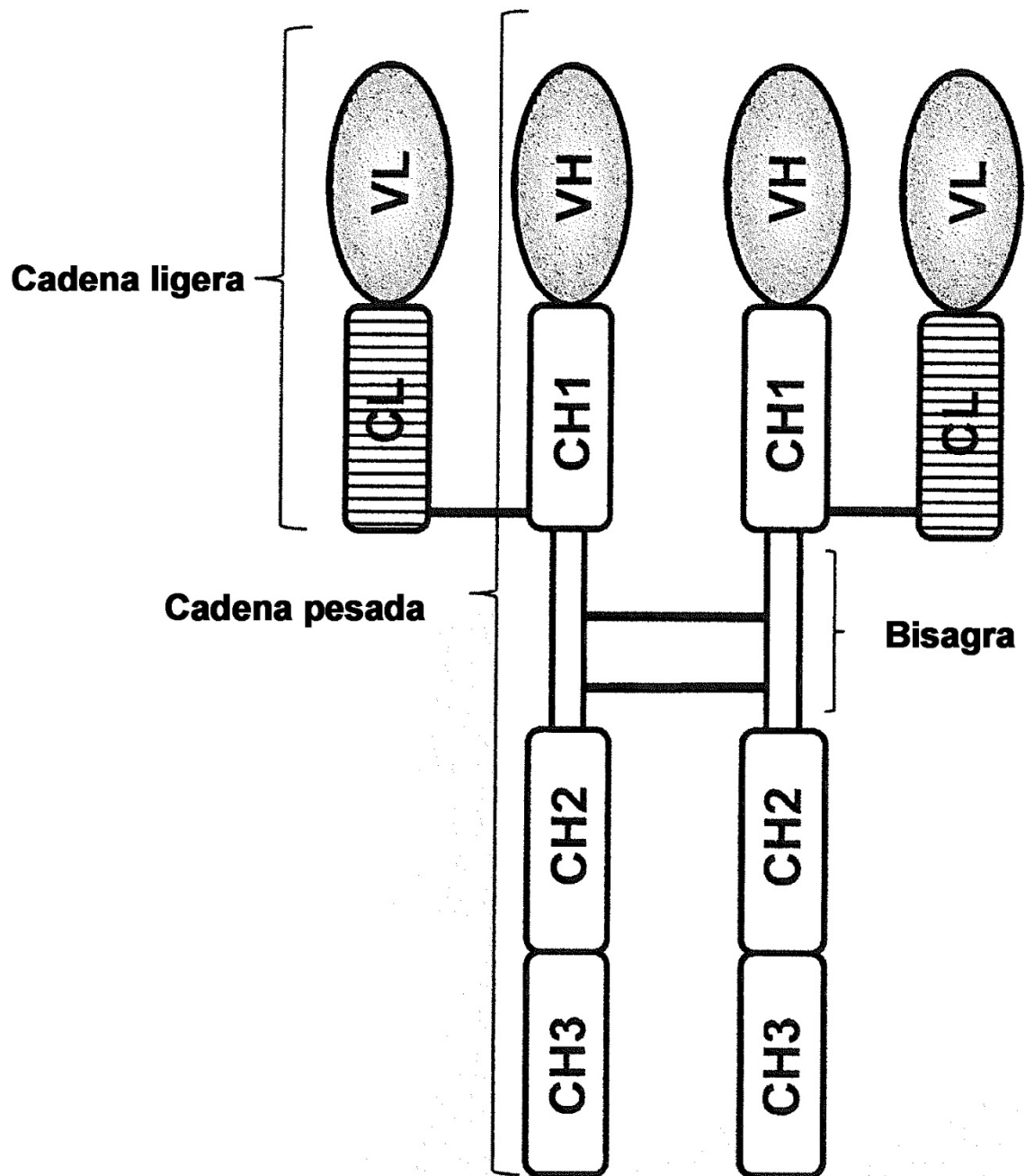


Fig.2A

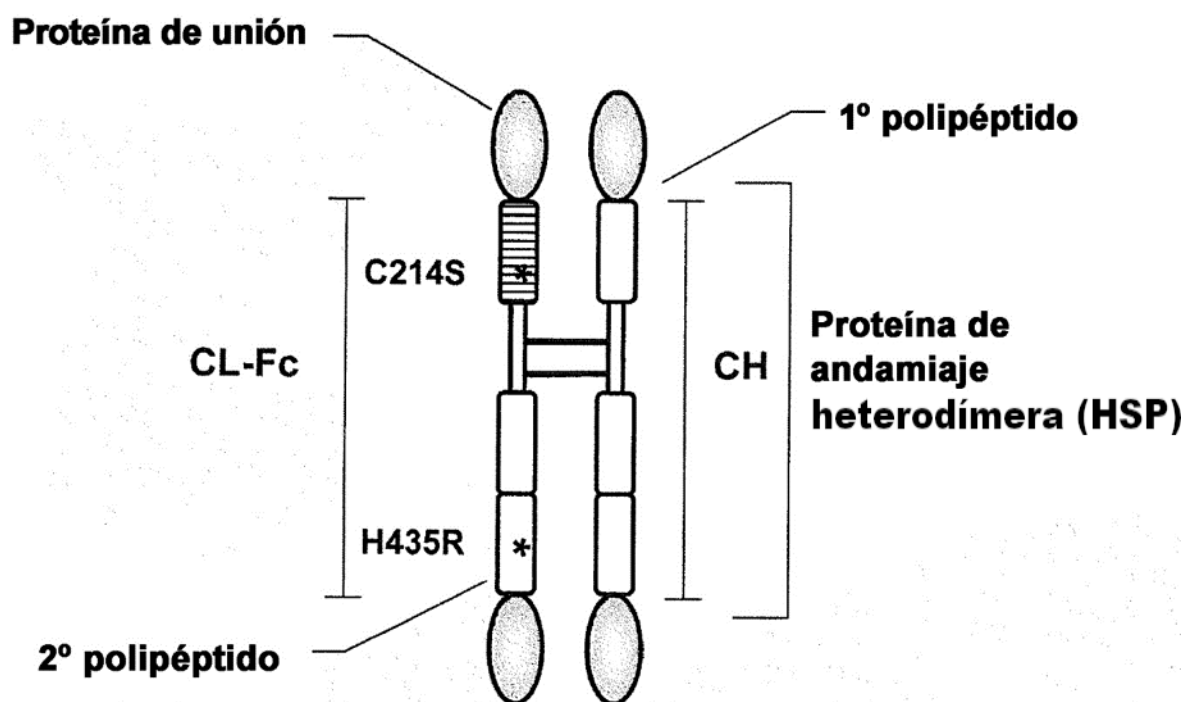


Fig.2B

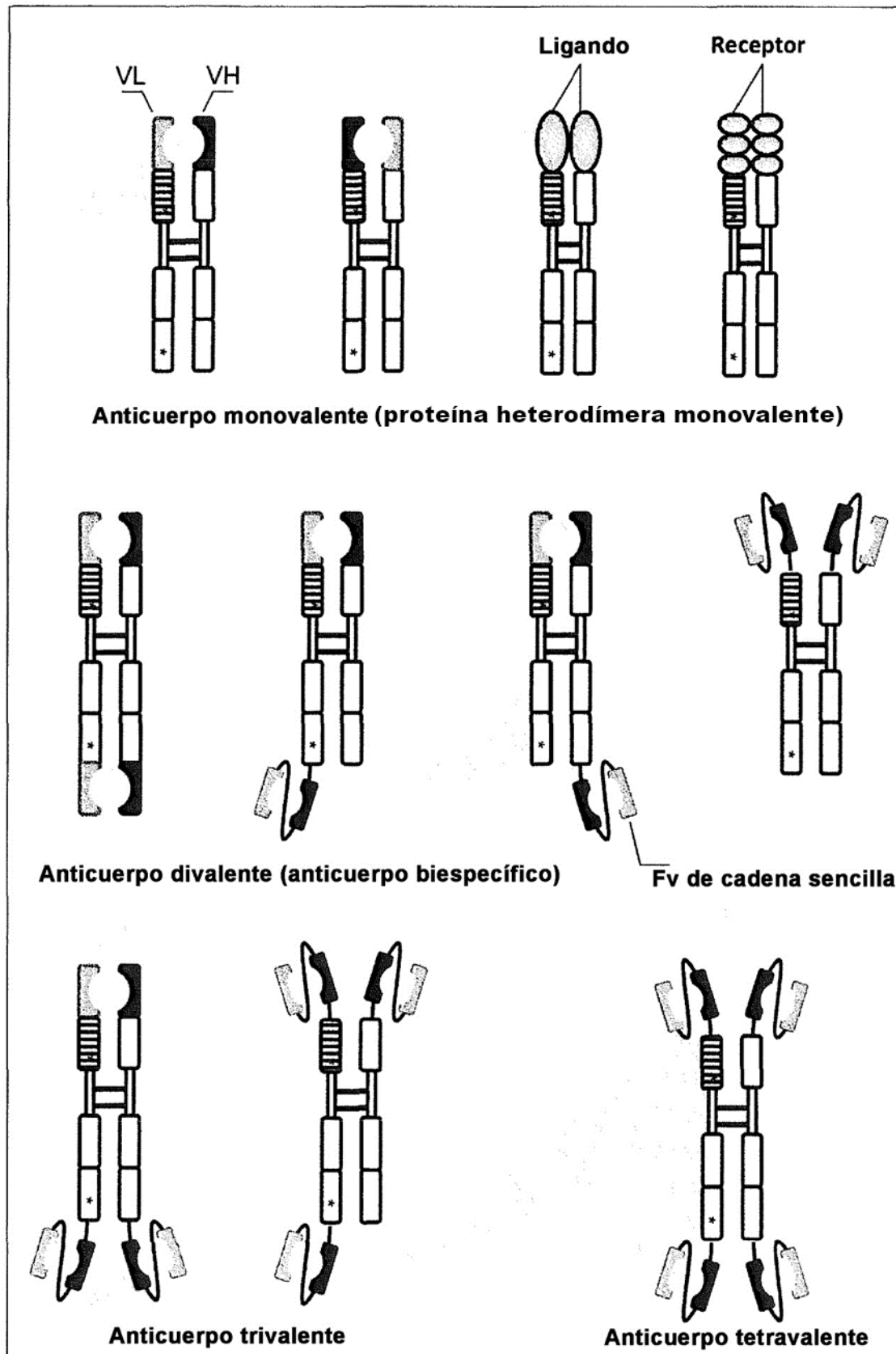


Fig.3A



Fig.3B

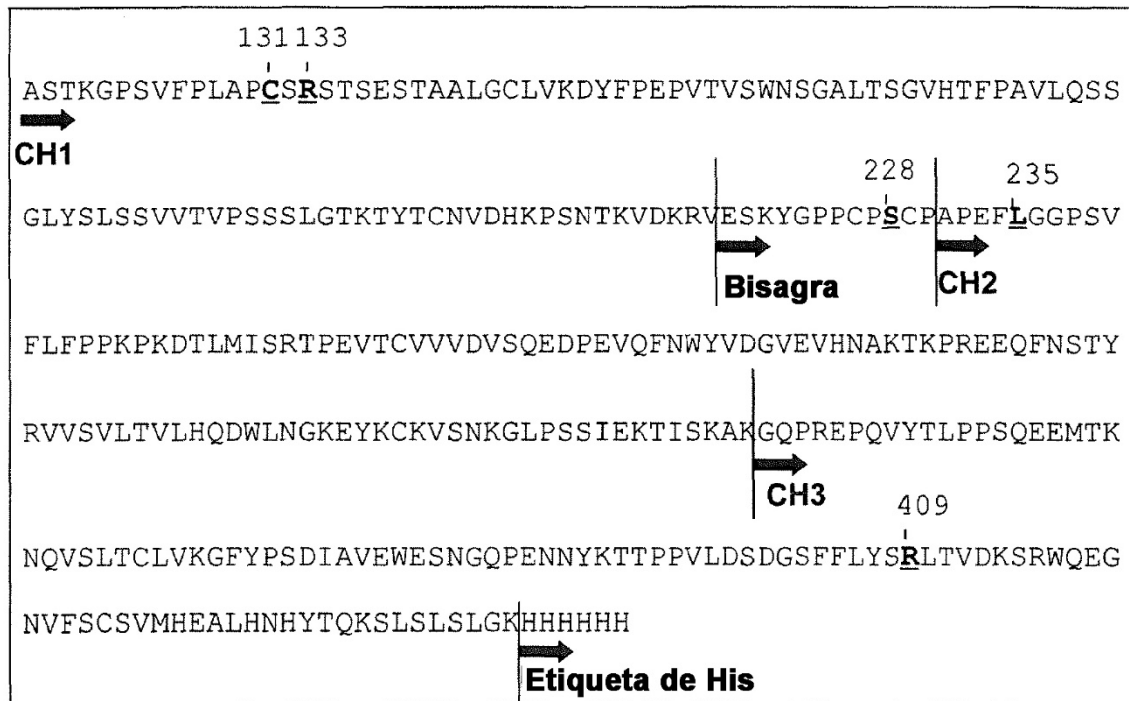


Fig.4A

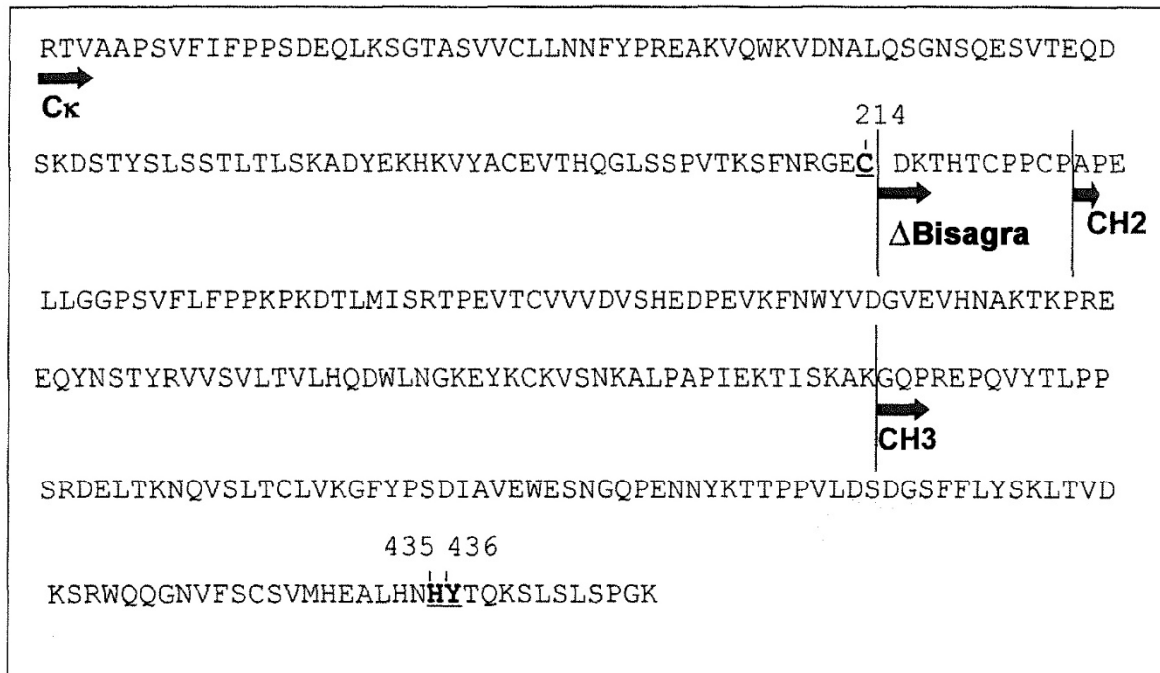


Fig.4B

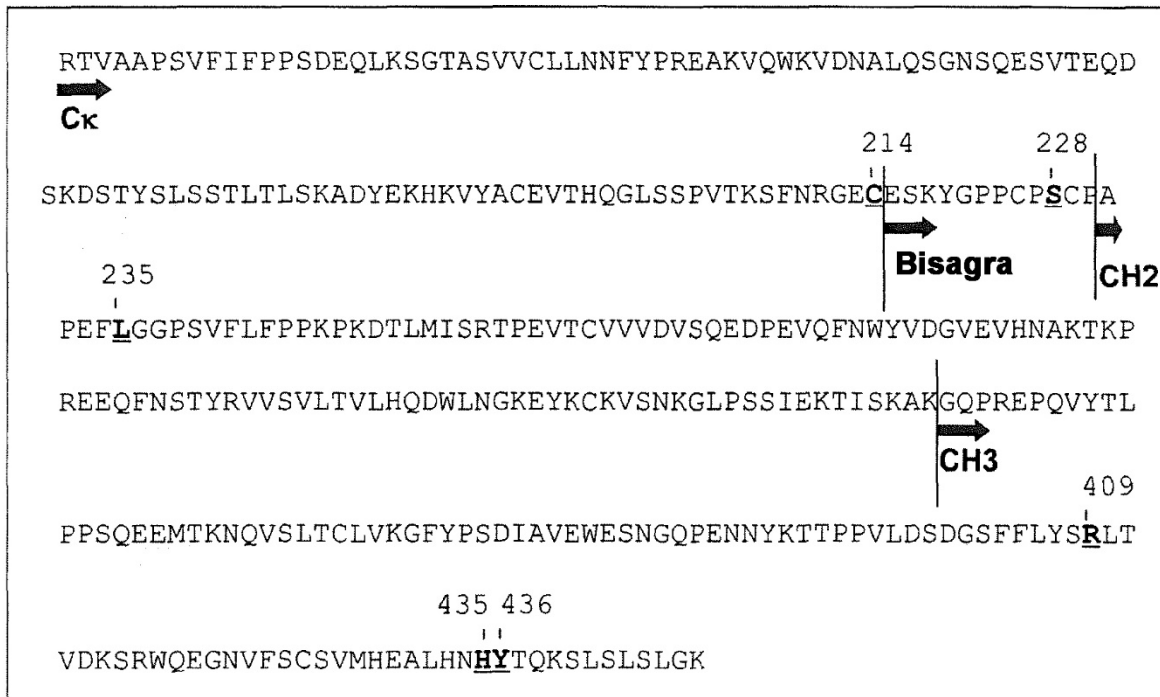


Fig.5

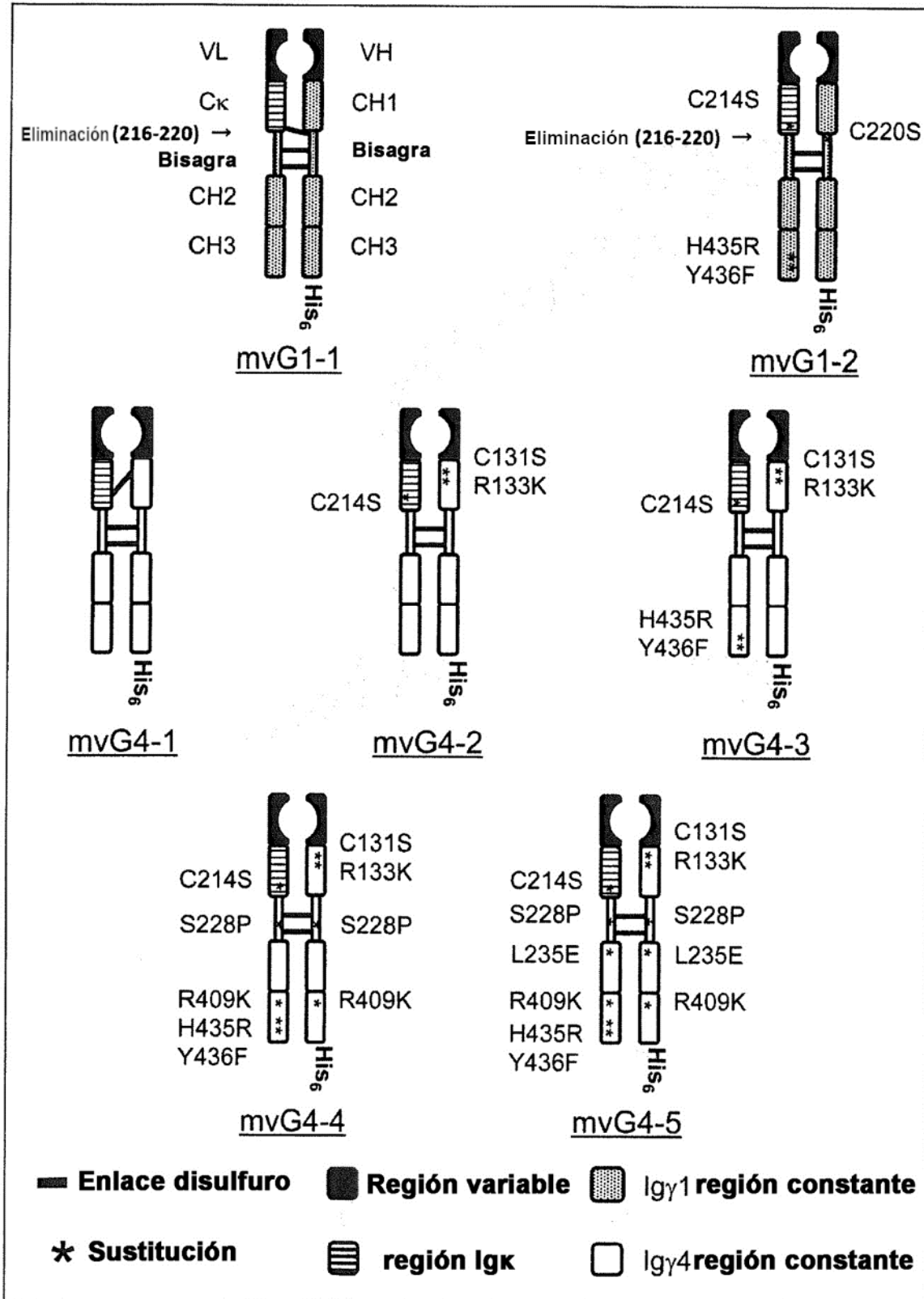


Fig.6

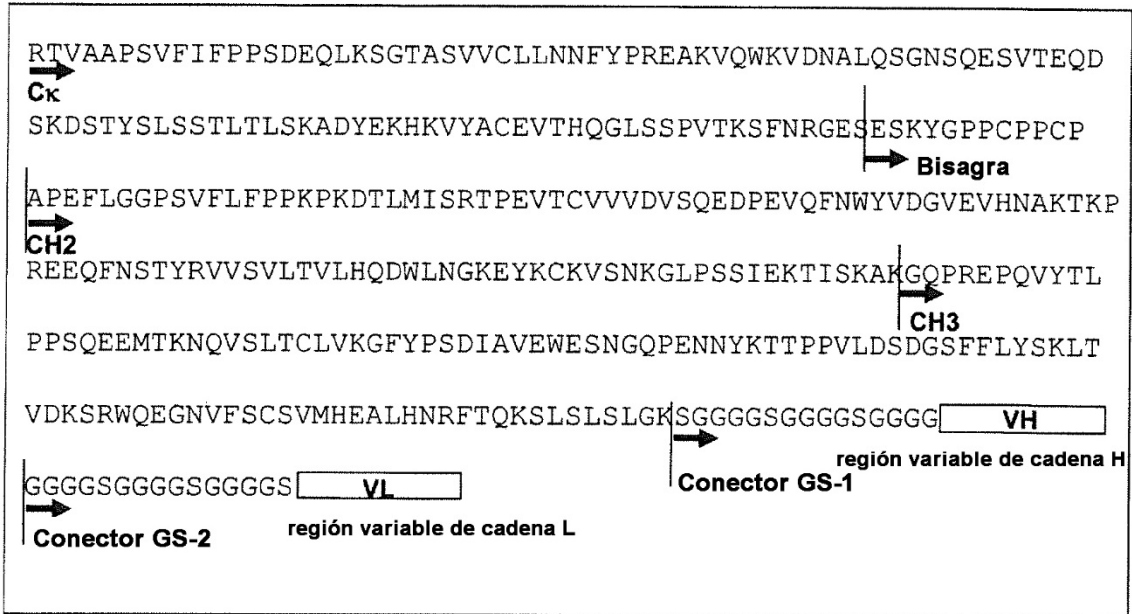
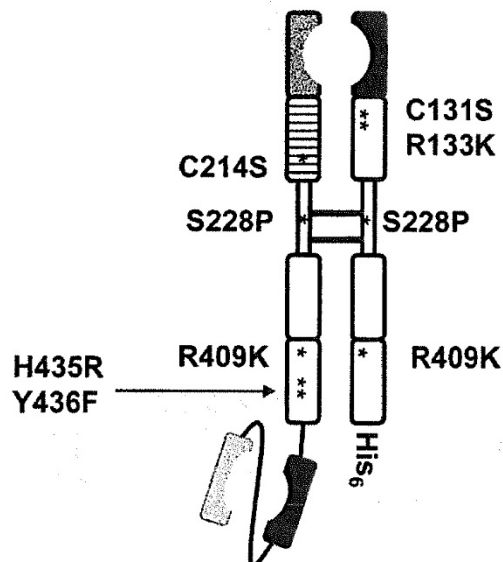


Fig.7



— Enlace disulfuro

■ Región variable

* Sustitución

▨ Región Igk

□ Igγ4 región constante

Fig.8A

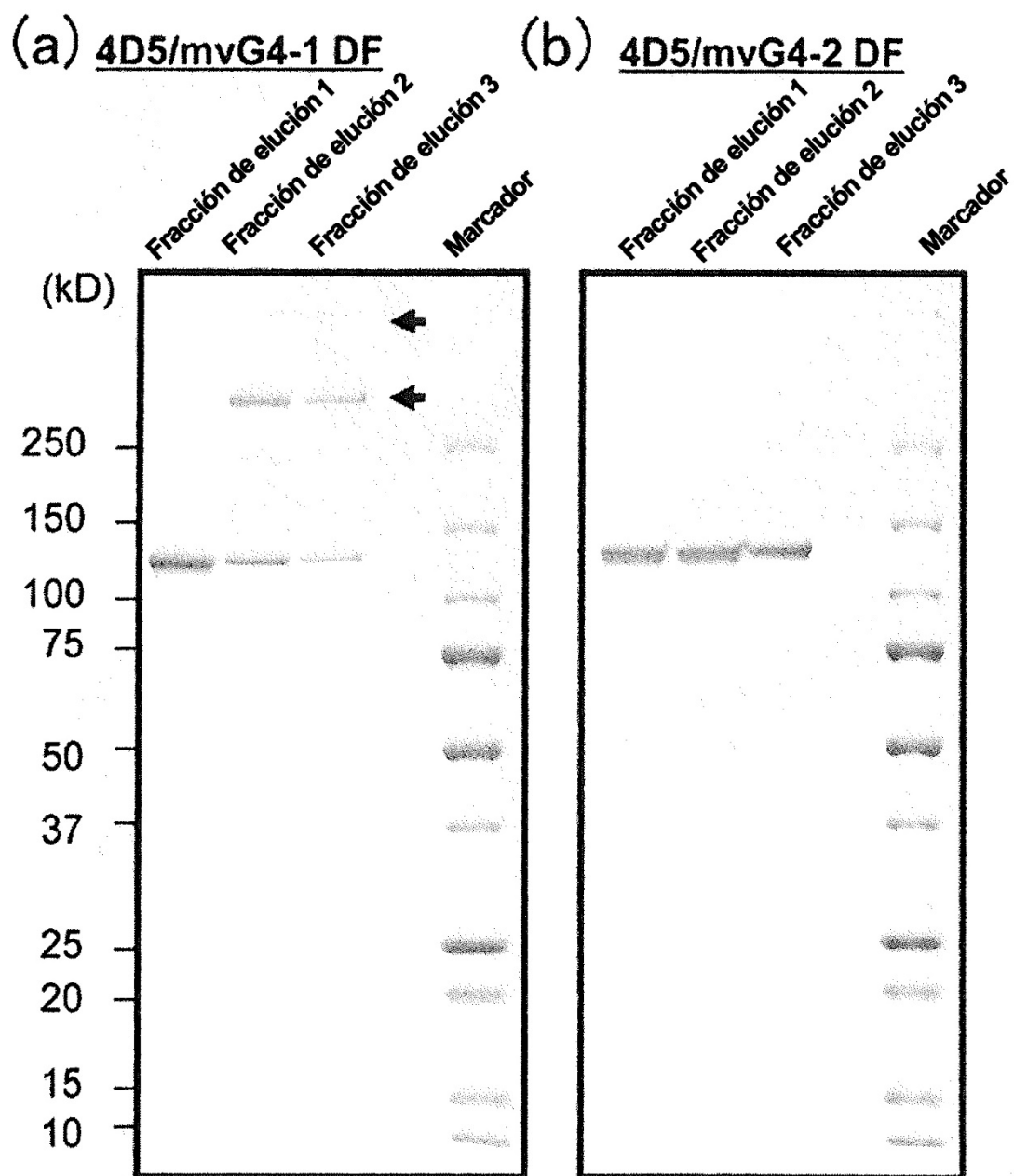


Fig.8B

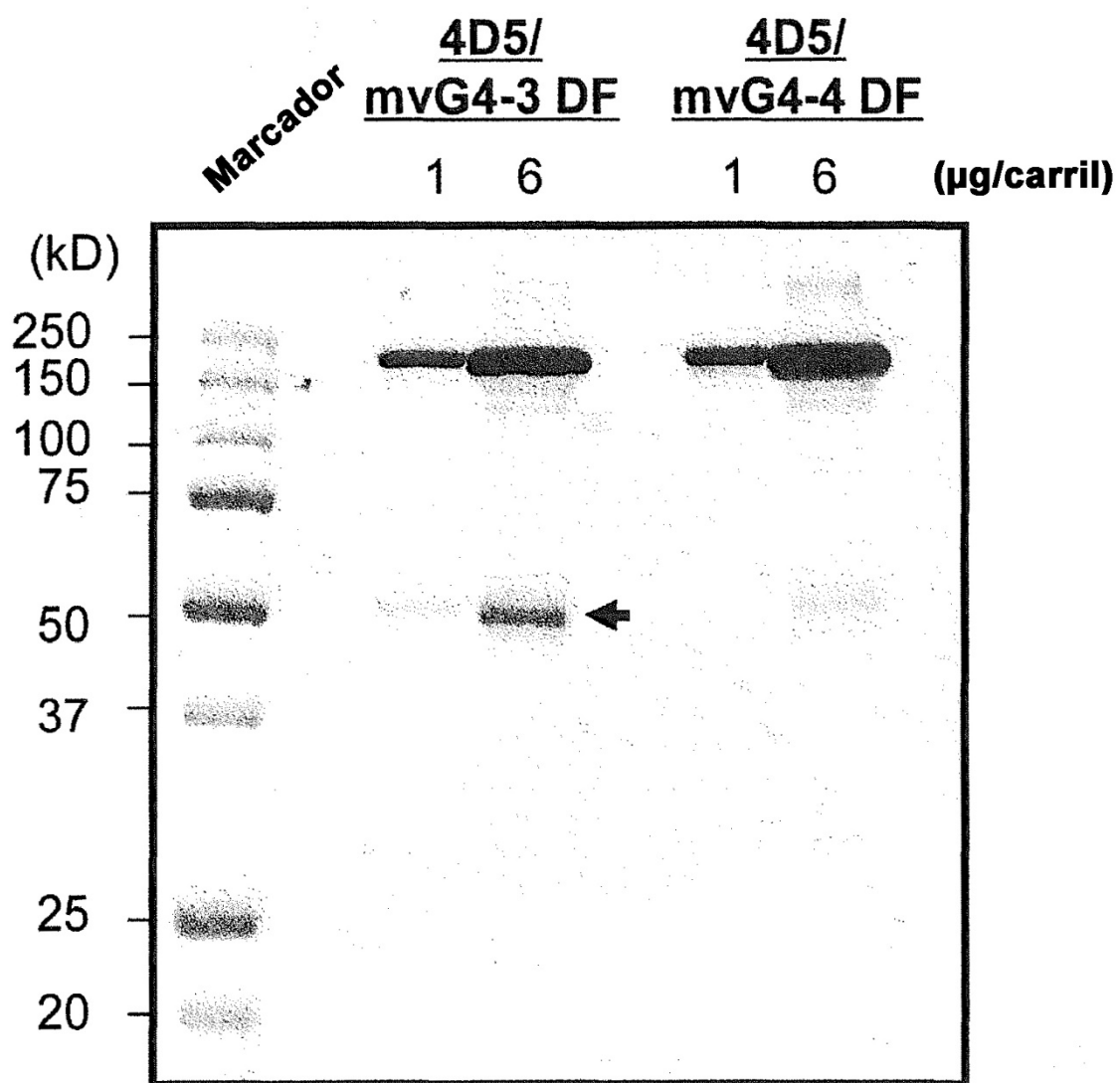


Fig.9

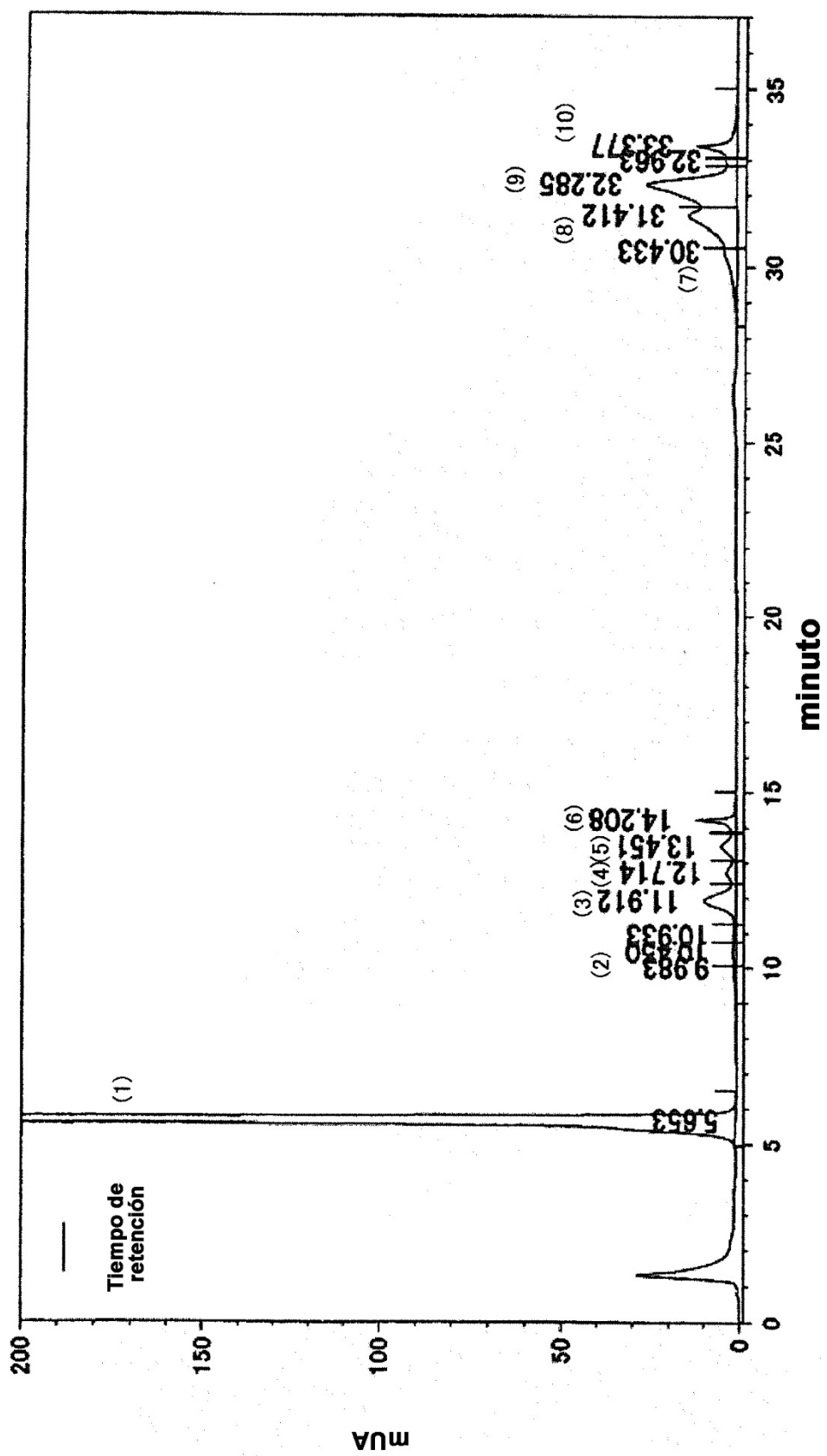


Fig.10

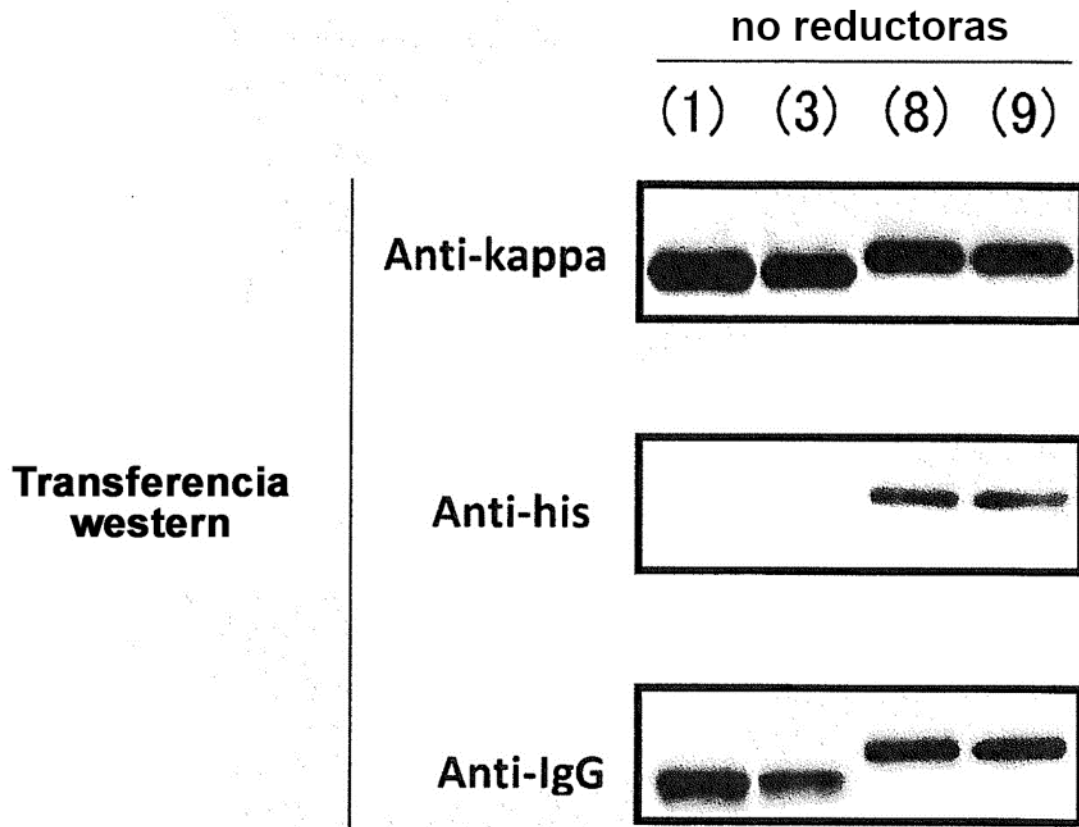


Fig.11

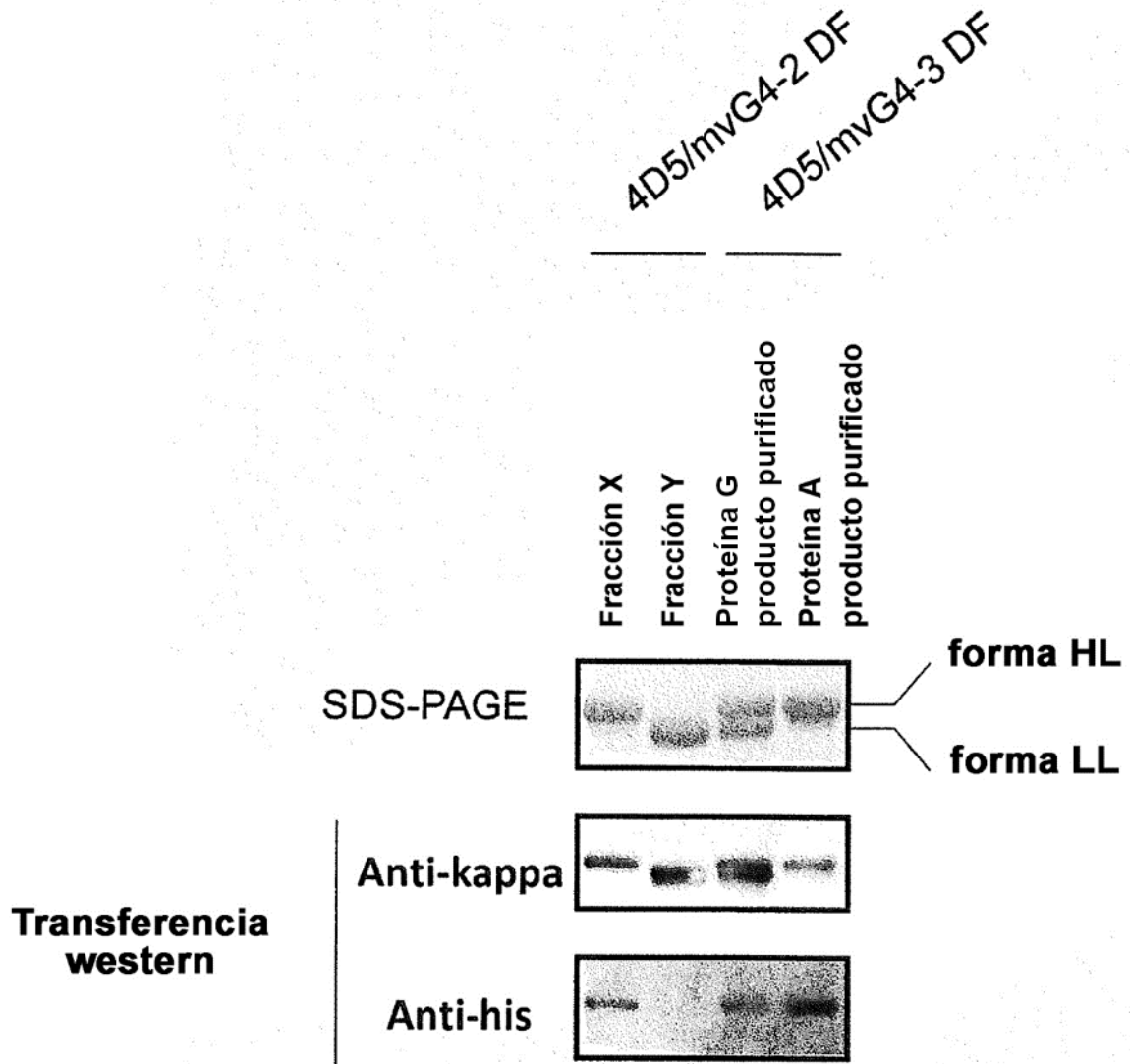
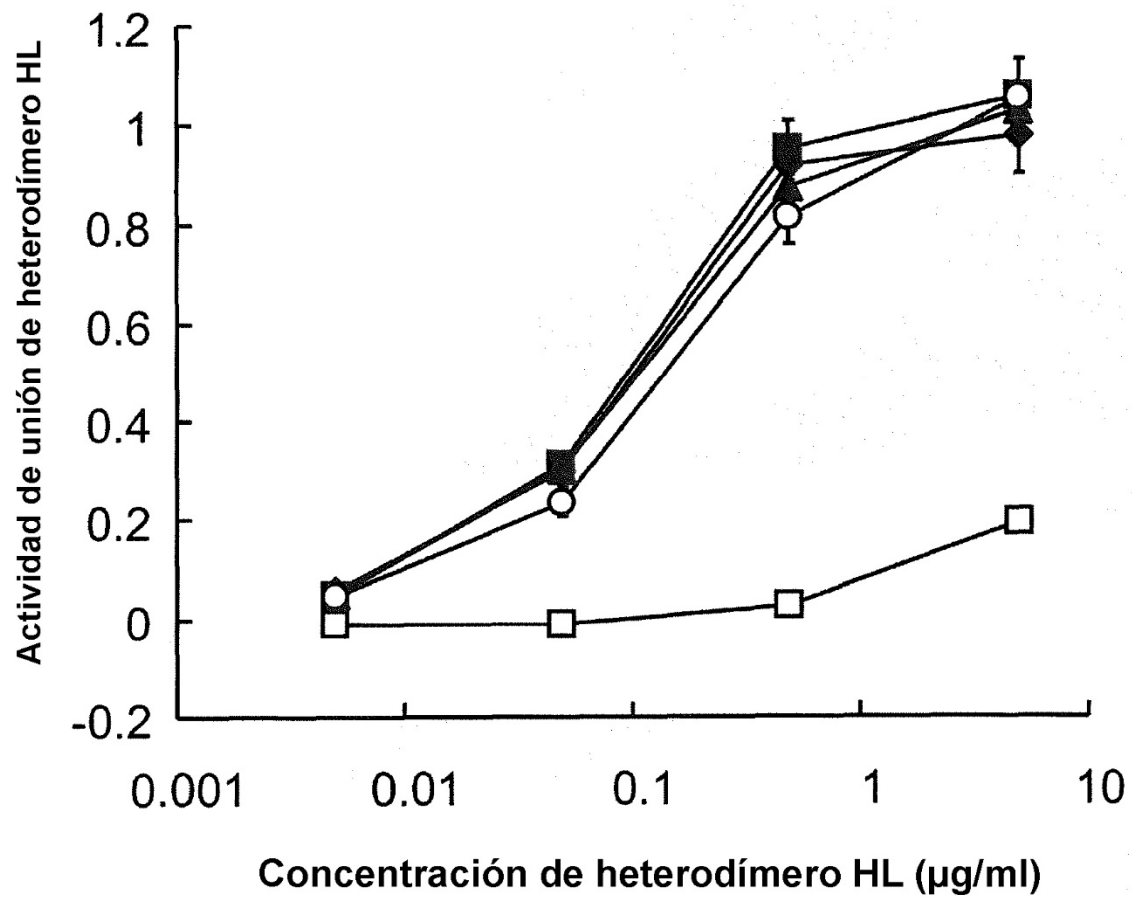


Fig.12



- 4D5/mvG4-3 DF
- ◆ 4D5/mvG4-4 F
- ▲ 4D5/mvG4-5 F
- 4D5/mvG4-2 DF **Fracción X**
- 4D5/mvG4-2 DF **Fracción Y**

Fig.13A

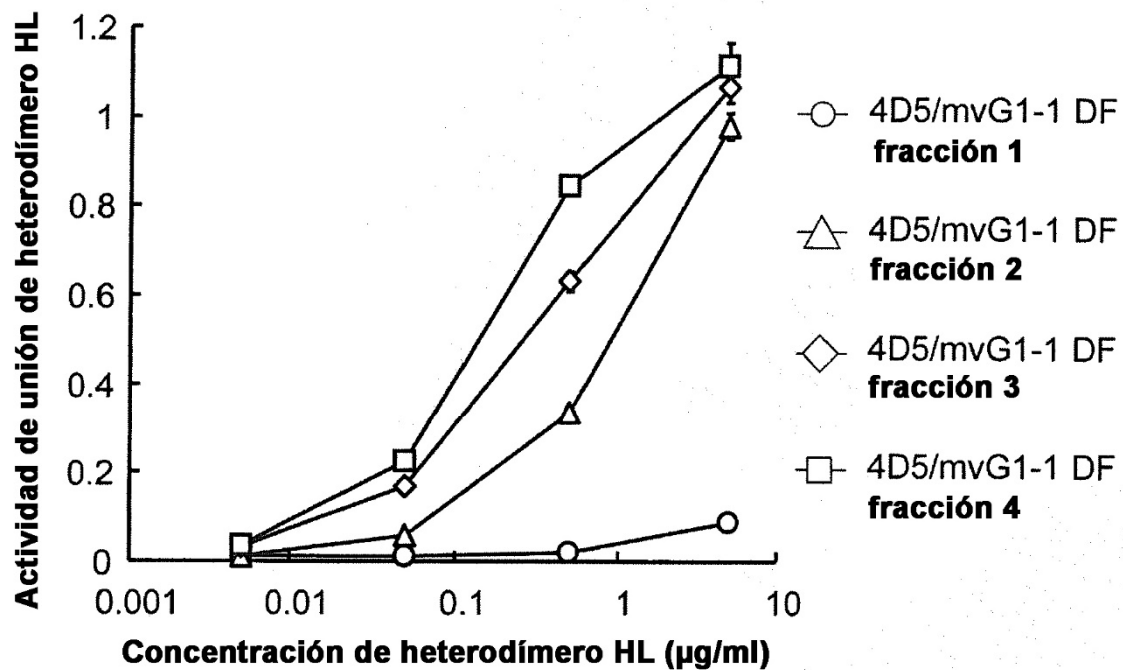


Fig.13B

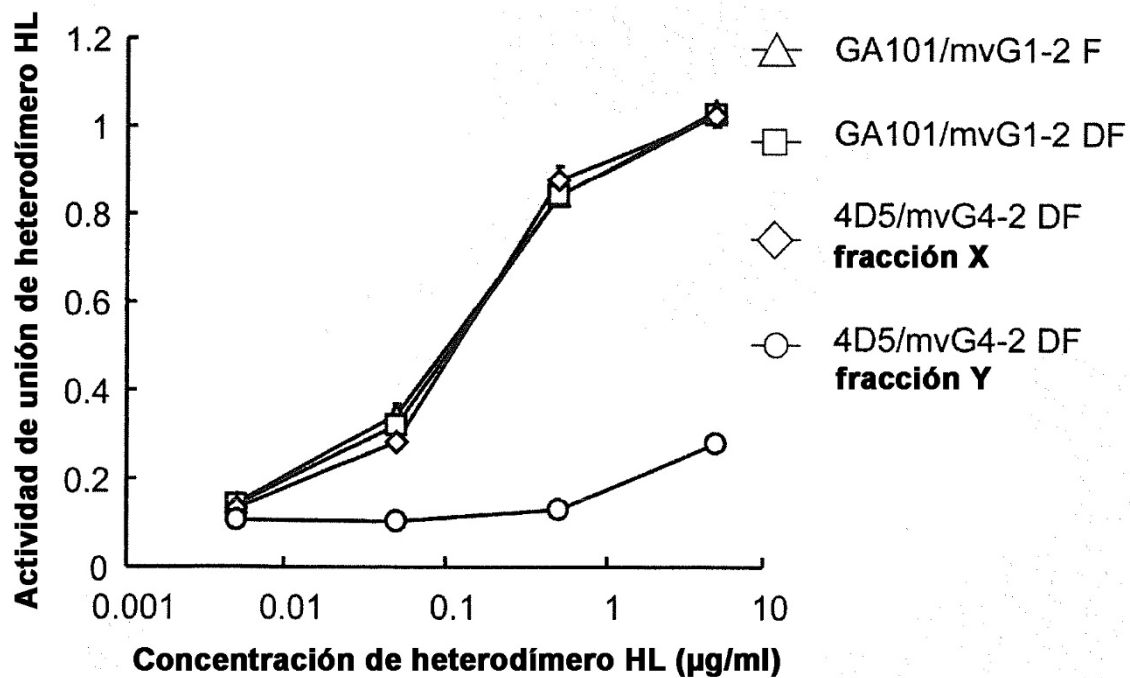


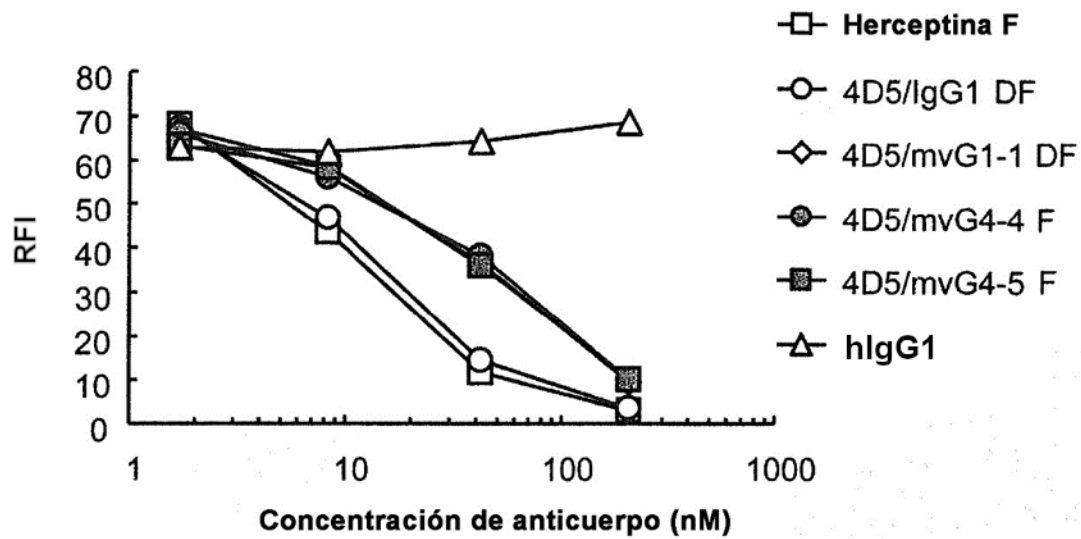
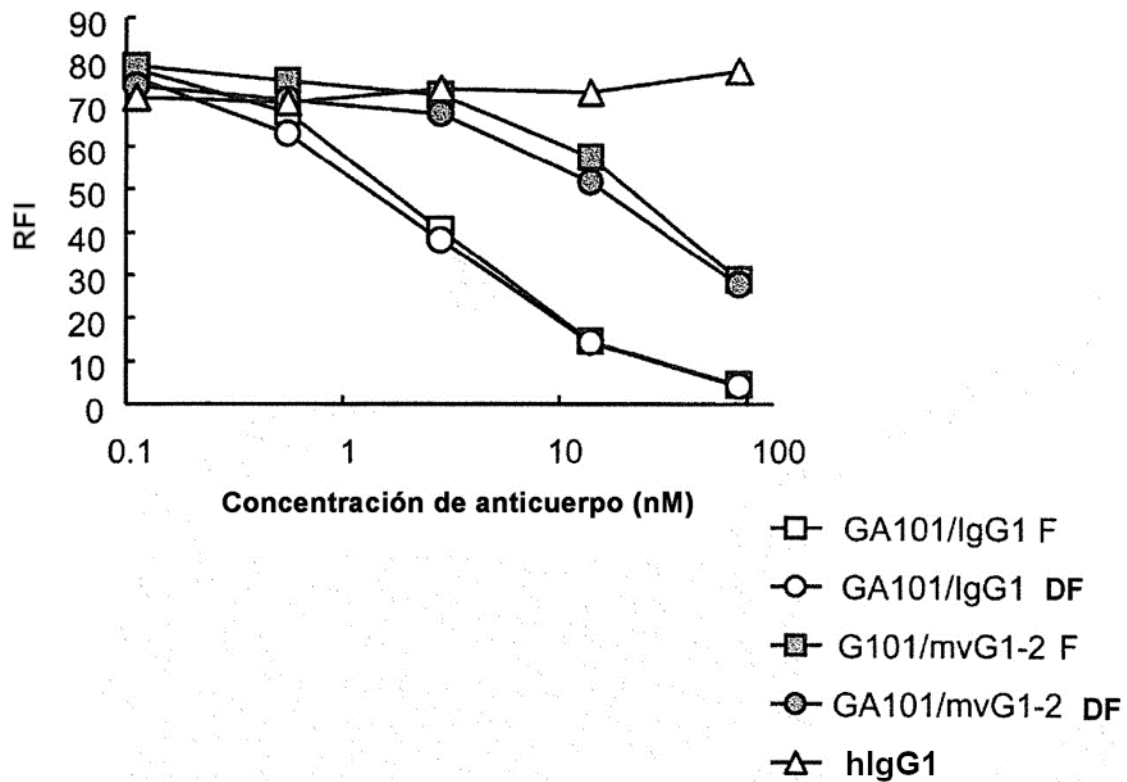
Fig.14A**Fig.14B**

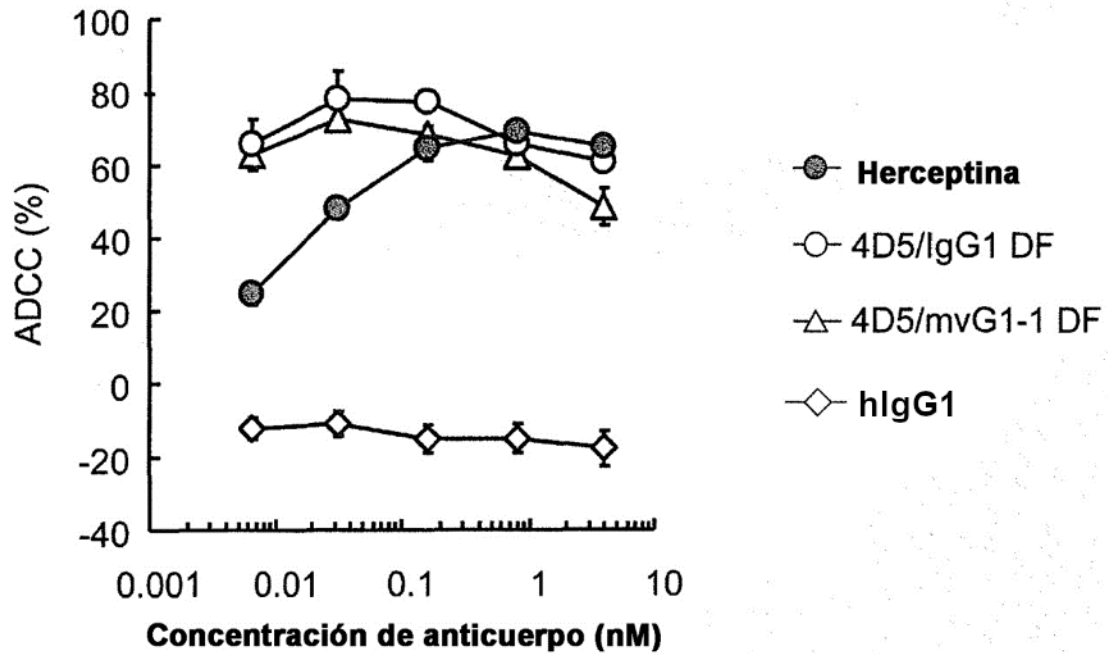
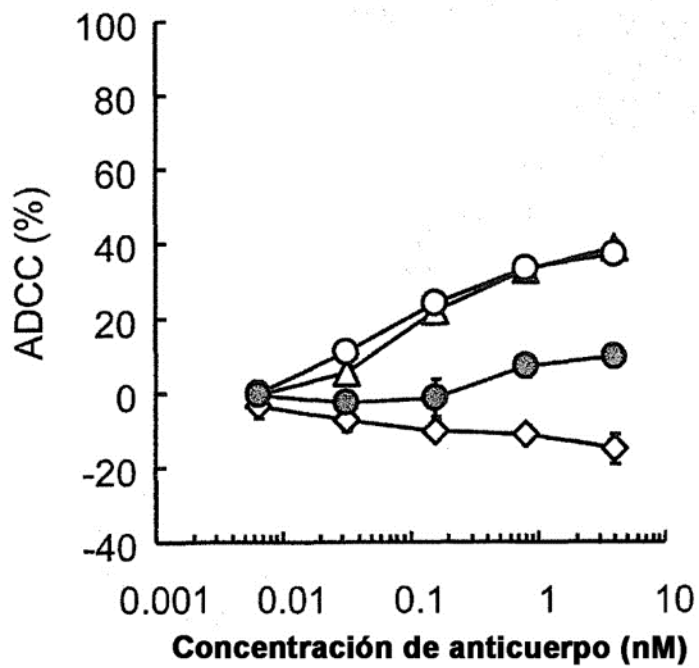
Fig.15A**(a) SK-BR-3****(b) BT-20**

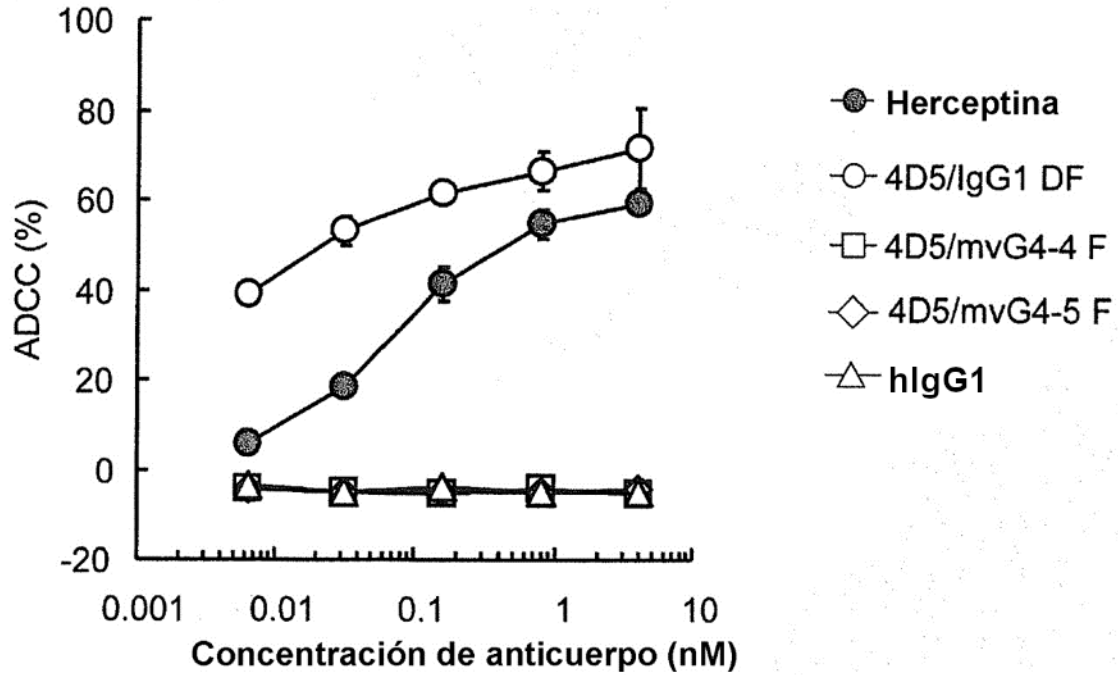
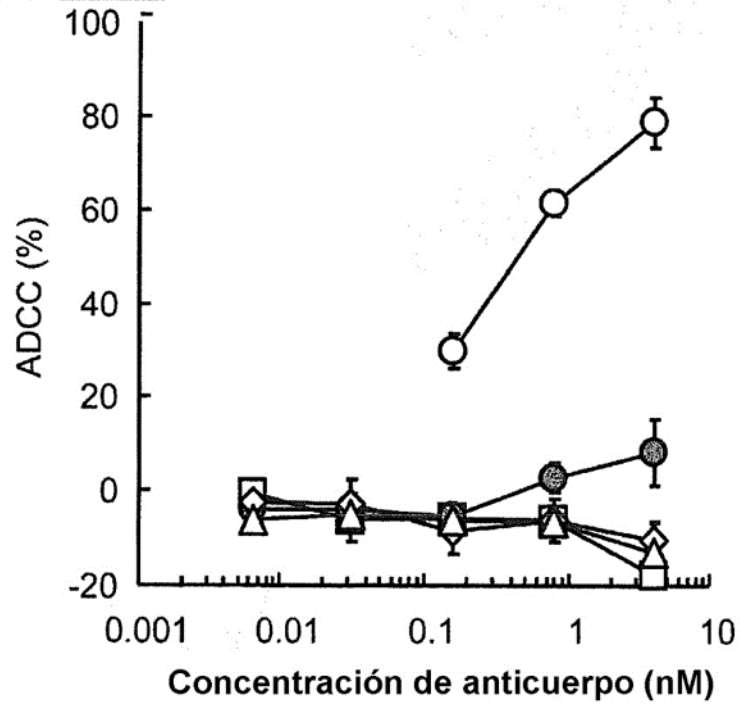
Fig.15B**(a) SK-BR-3****(b) BT-20**

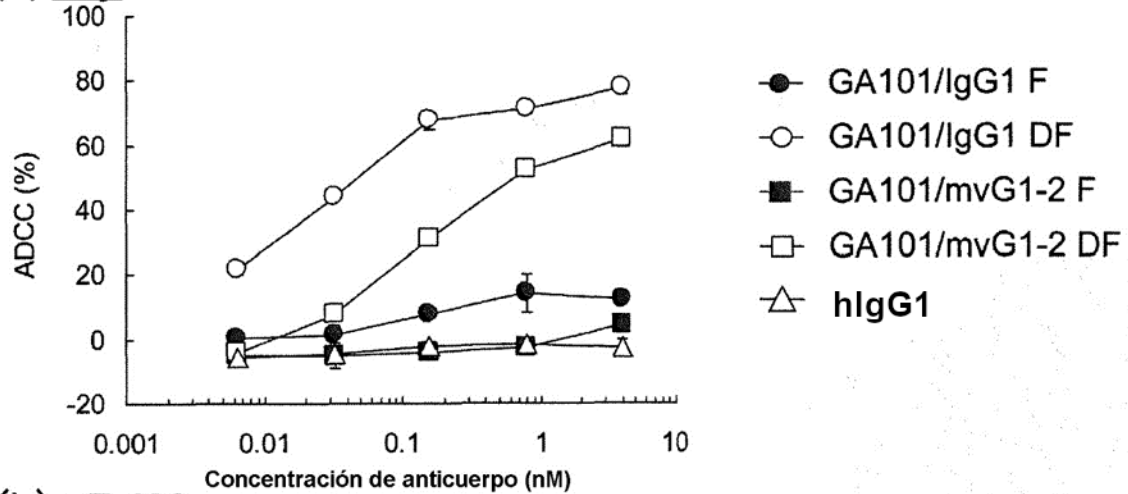
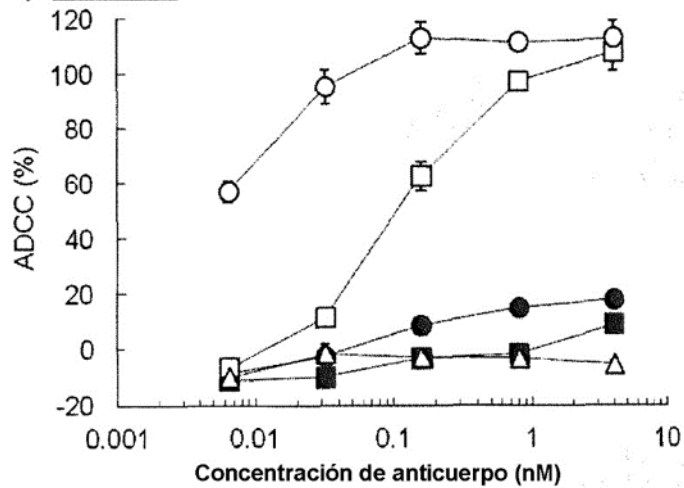
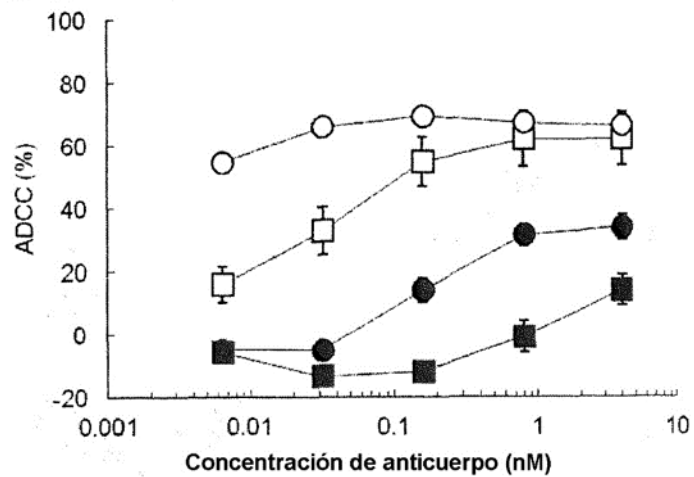
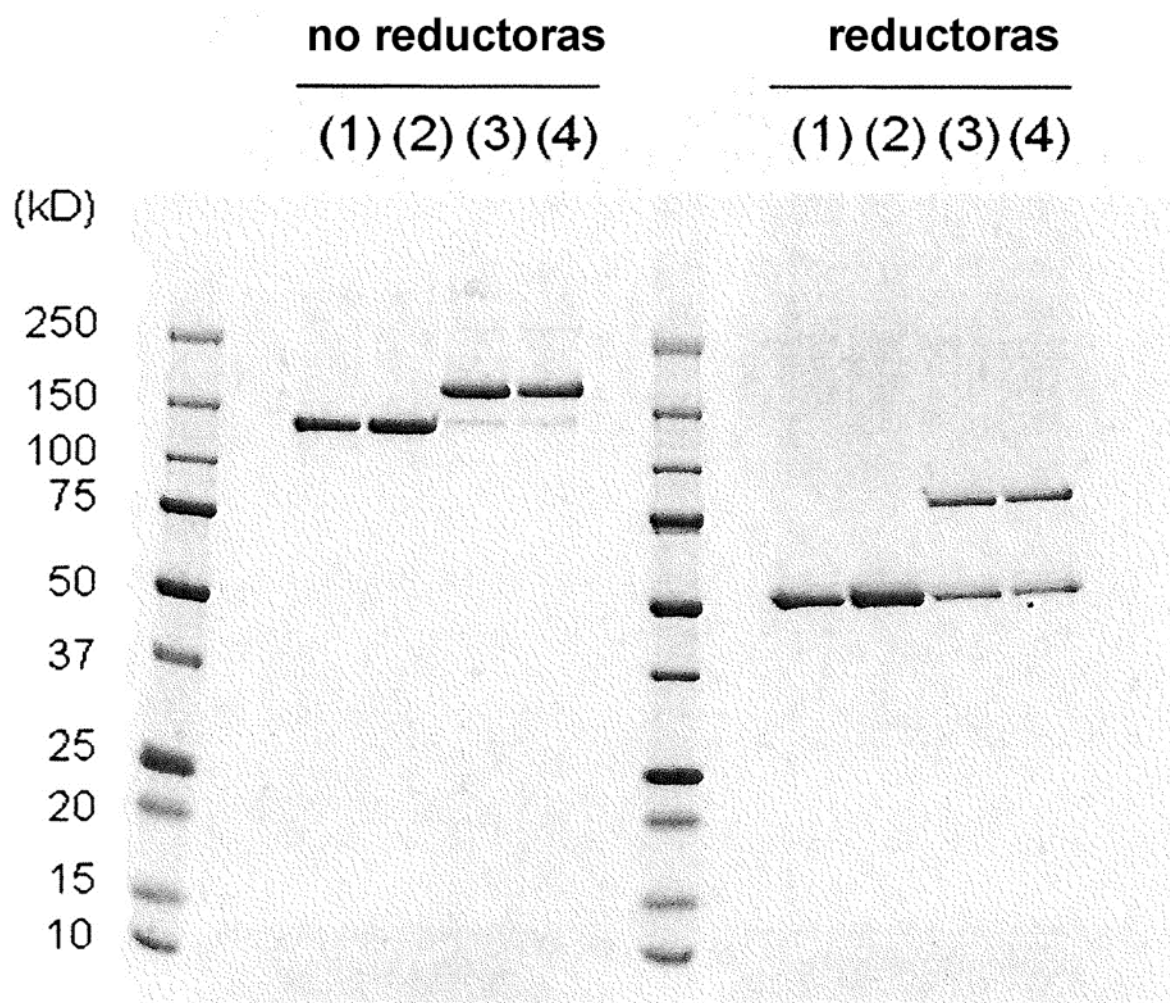
Fig.16**(a) Raji****(b) ST-486****(c) MEC-1**

Fig.17

- (1) 4D5/mvG4-4 F
- (2) hLL1/mvG4-4 F
- (3) hLL1-4D5/mvG4-4 F
- (4) hLL1-2F2/mvG4-4 F

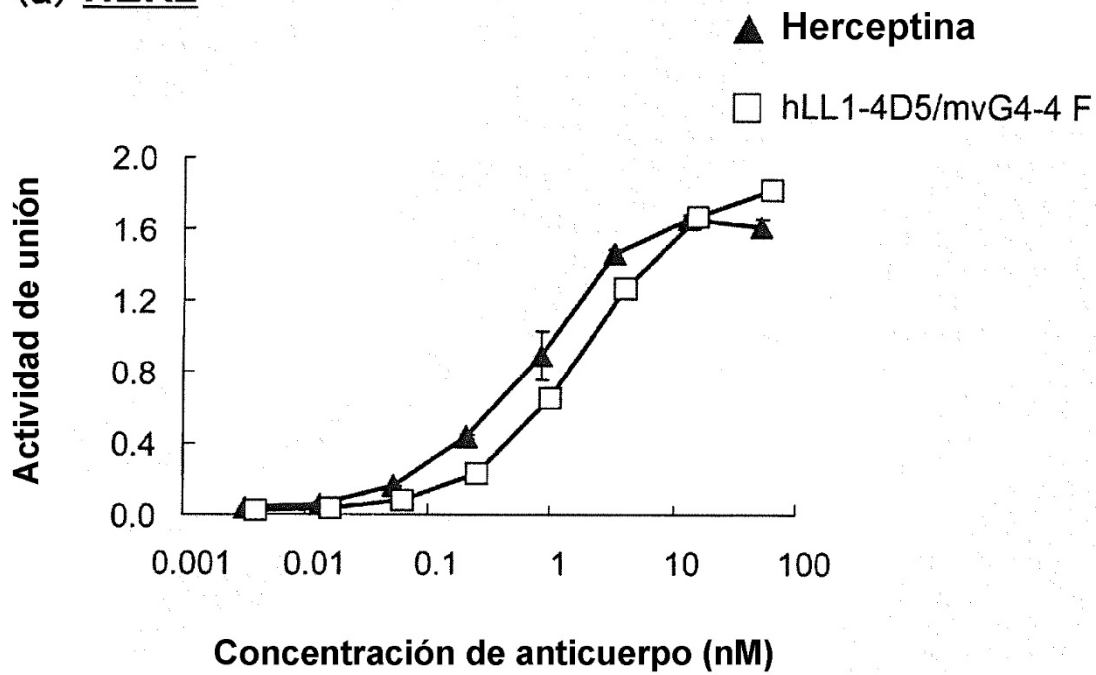
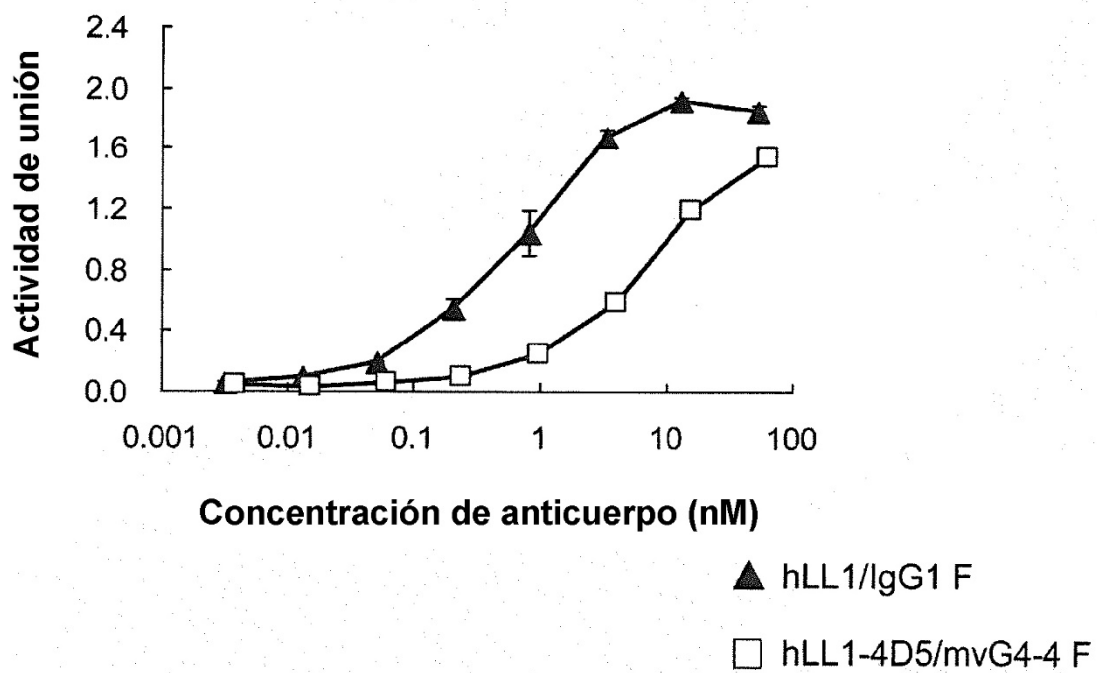
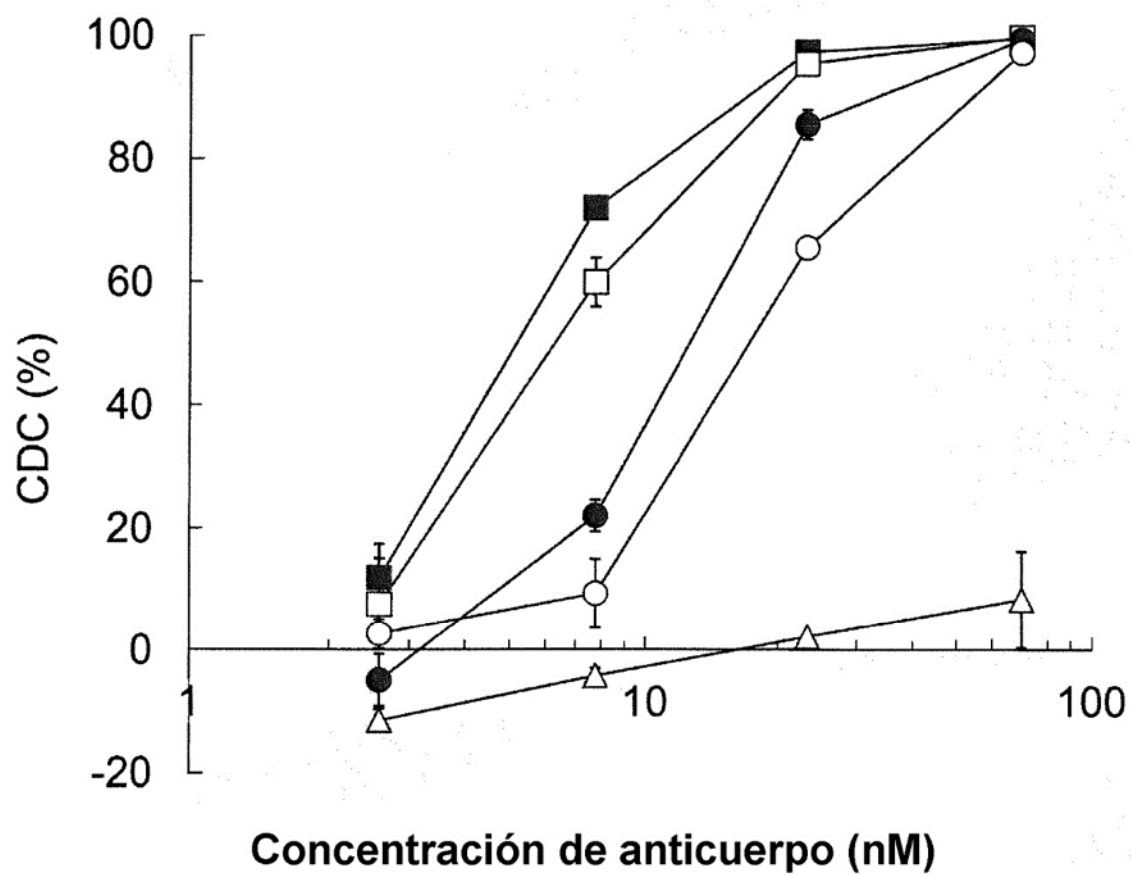
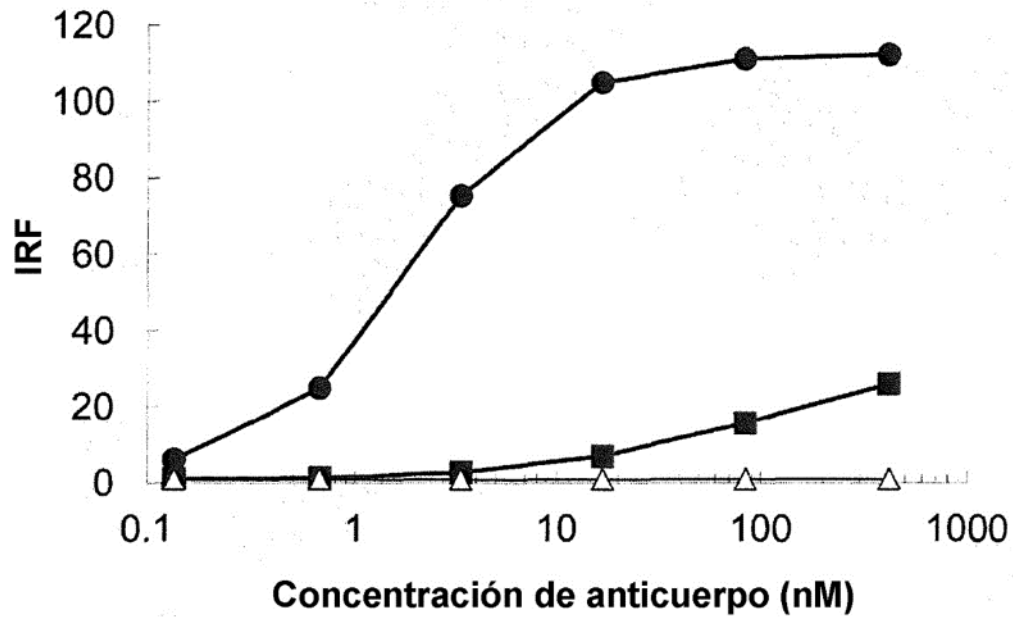
Fig.18**(a) HER2****(b) CD74**

Fig.19

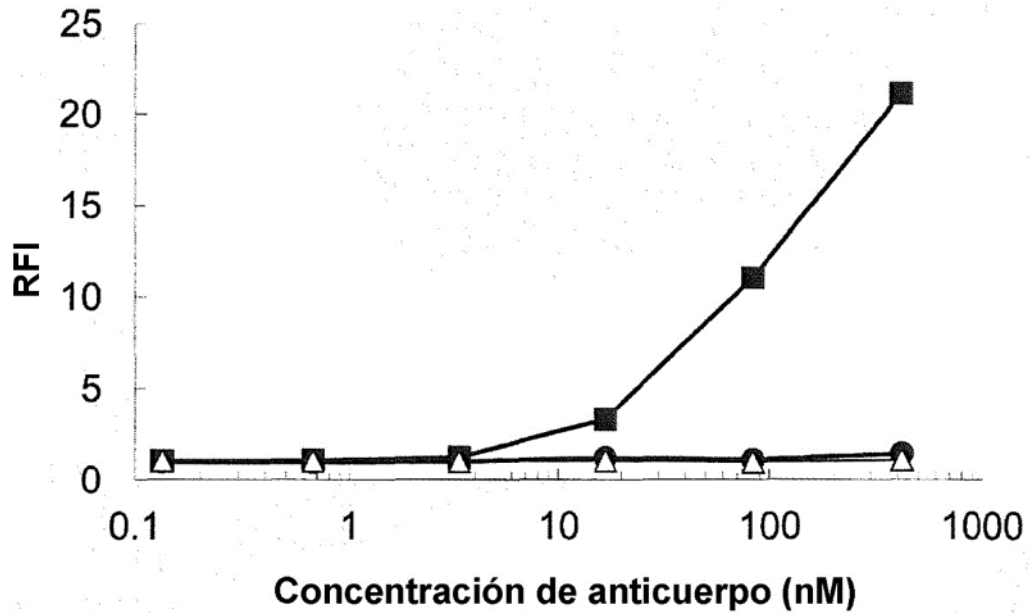
- GA101/IgG1 F
- GA101/IgG1 DF
- GA101/mvG1-2 F
- GA101/mvG1-2 DF
- △ hIgG1

Fig.20

(a)



(b)



■ GA101/mvG1-2 F

● GA101/IgG1 F

△ hIgG1

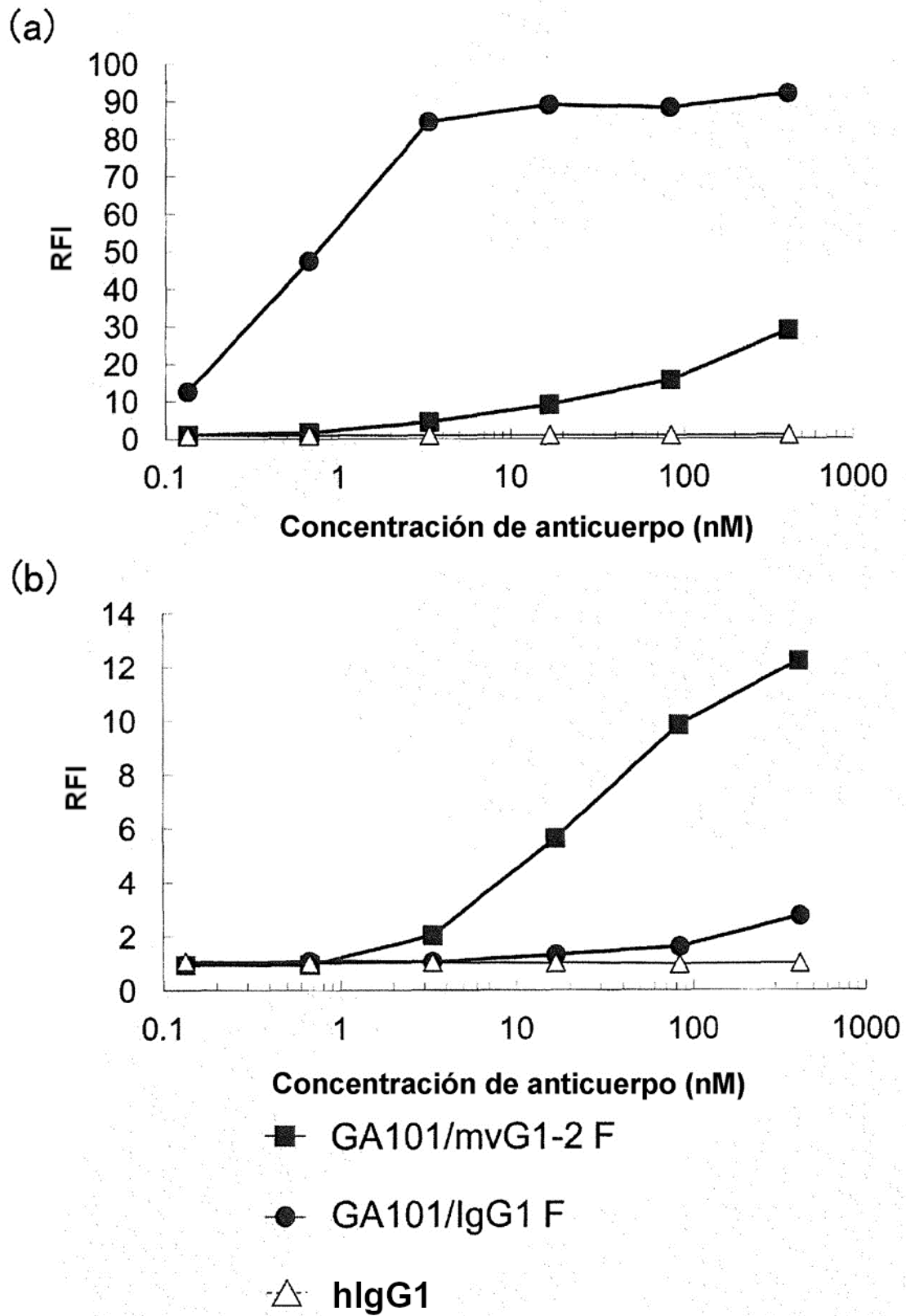
Fig.21

Fig.22A

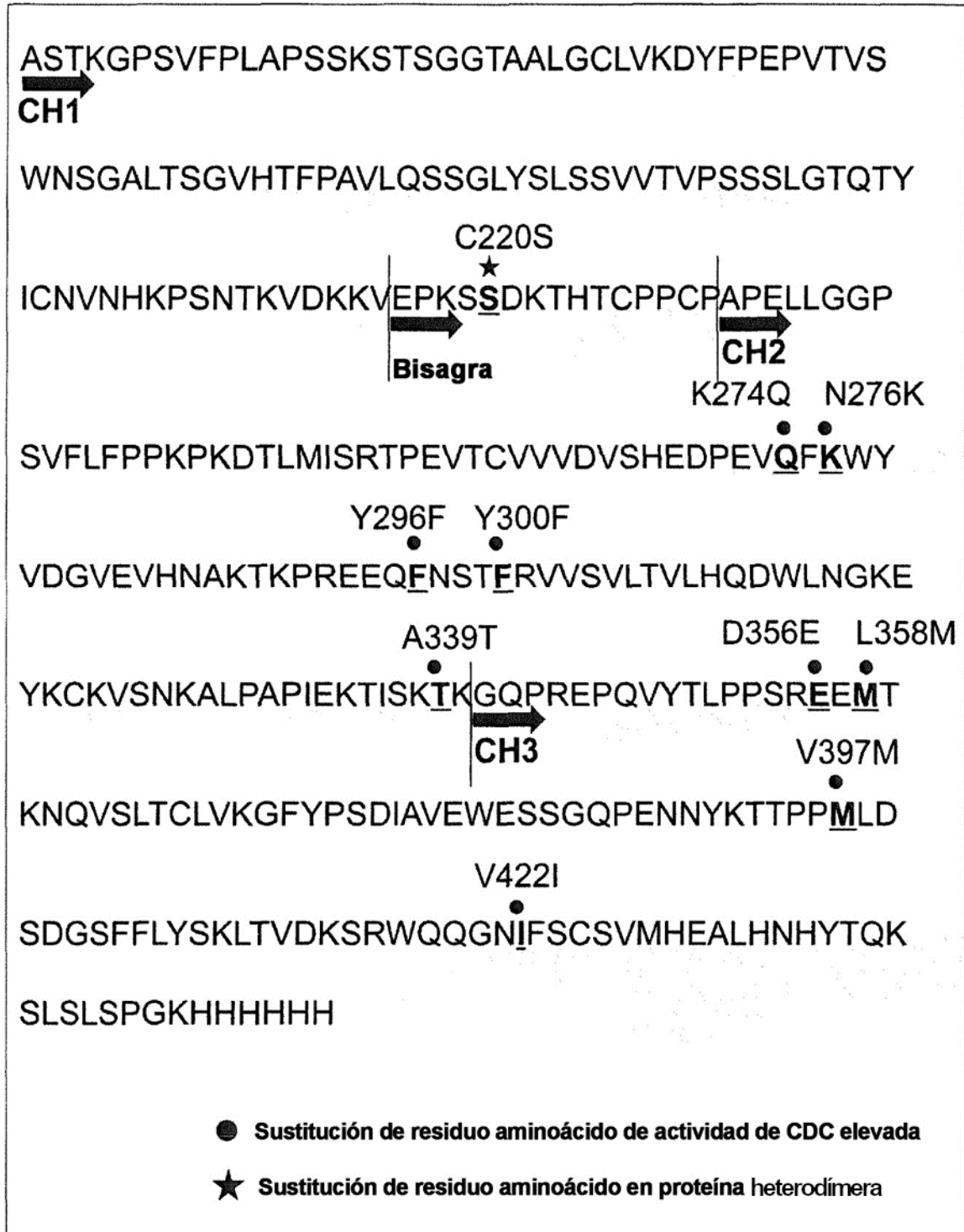


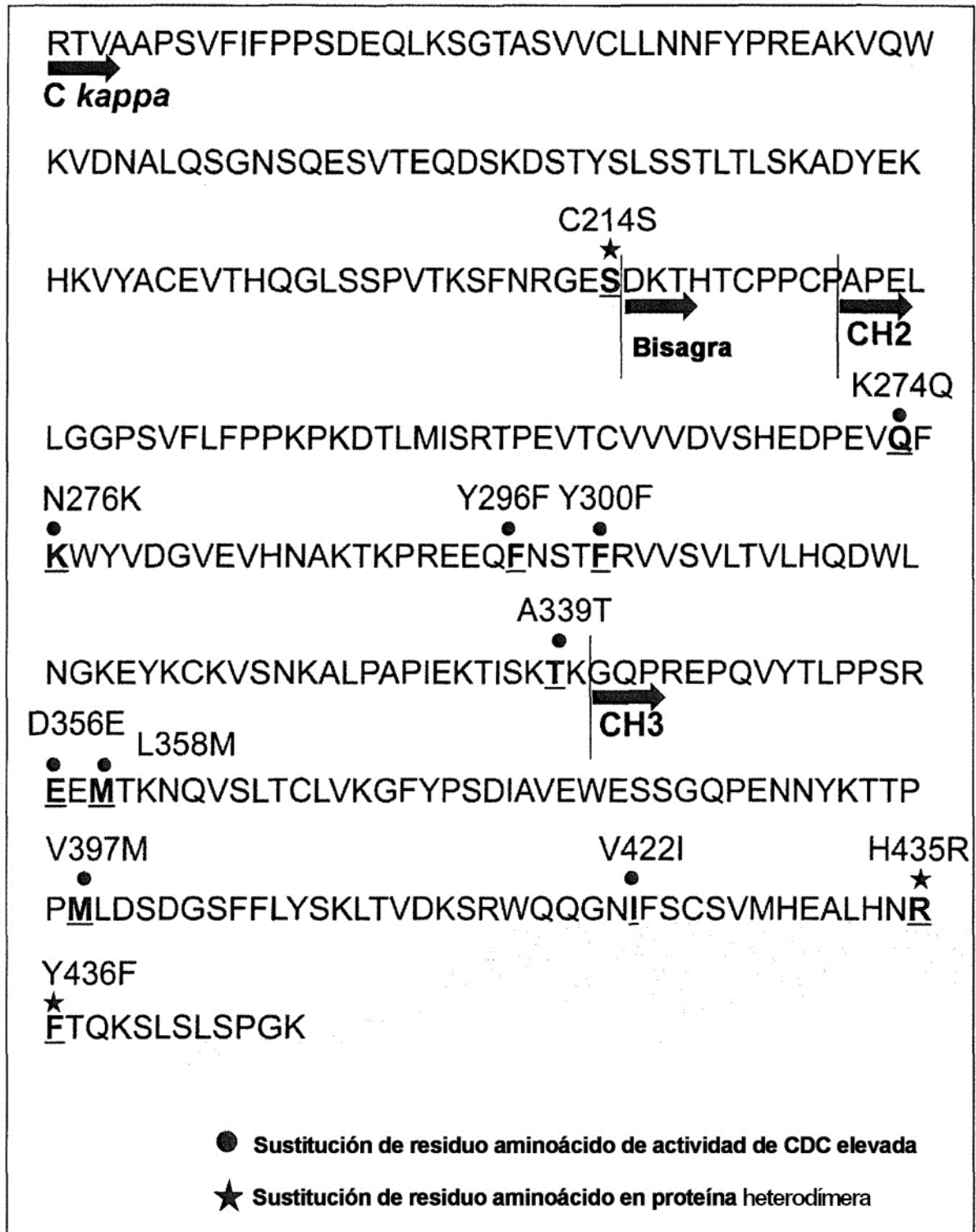
Fig.22B

Fig.23

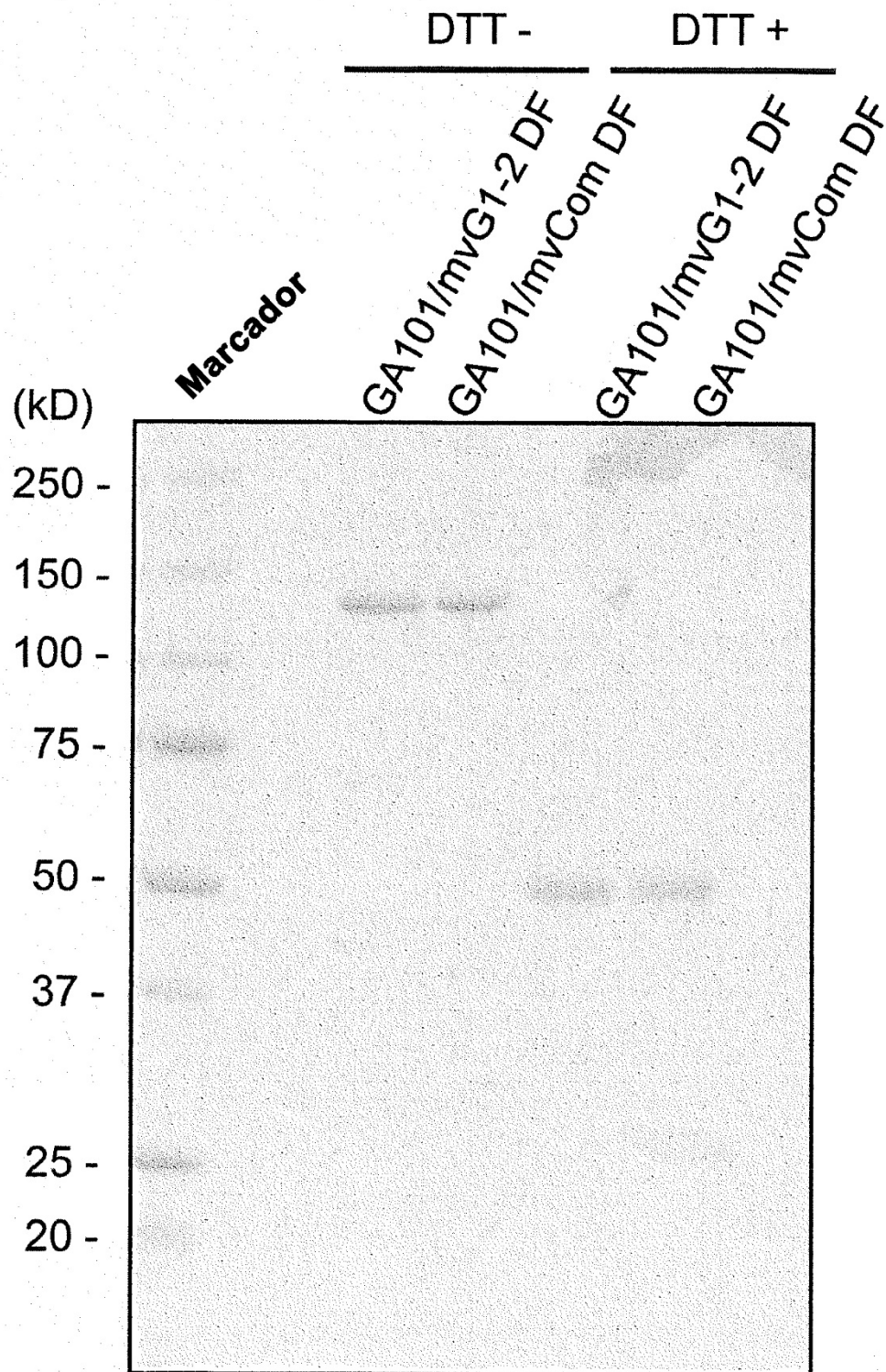


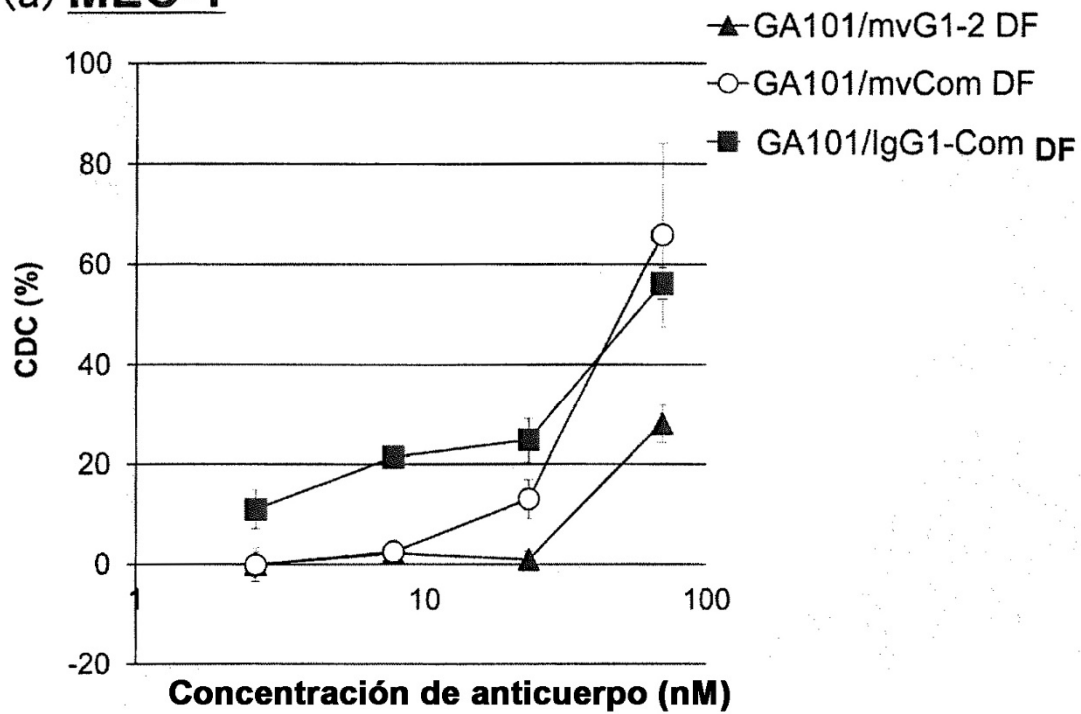
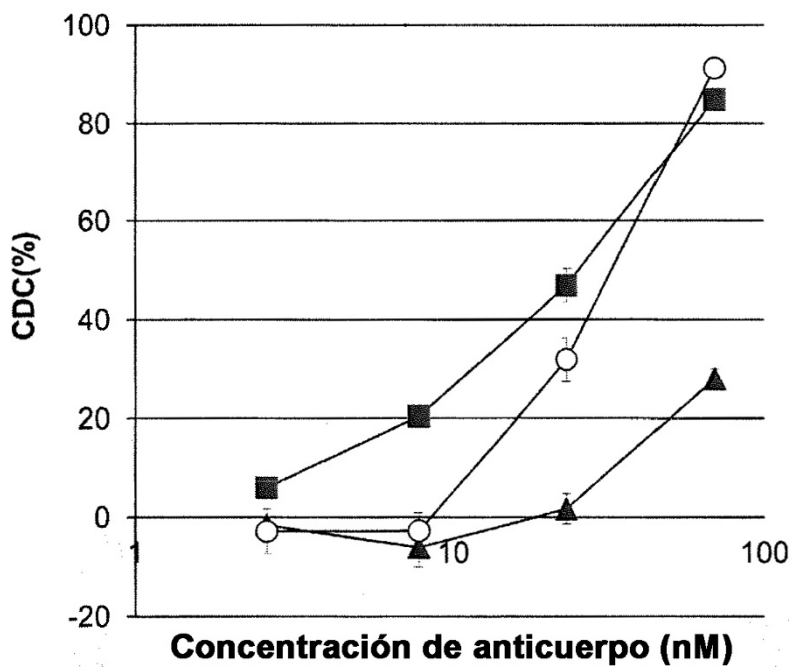
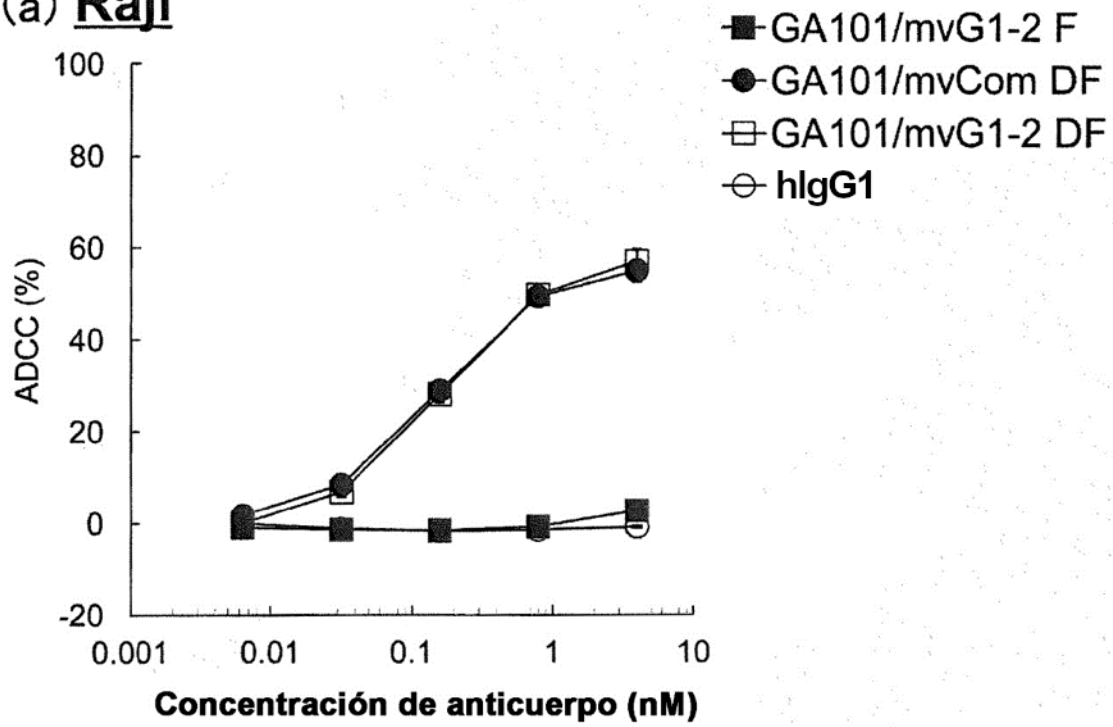
Fig.24**(a) MEC-1****(b) Raji**

Fig.25**(a) Raji****(b) MEC-1**