(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 776 681**

(51) Int. CI.:

A61K 39/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.08.2013 PCT/JP2013/072507**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2014 WO14030728**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2013 E 13831250 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 2889377**

(54) Título: **Variante de la región Fc específica de FcγRIIb**

(30) Prioridad:

24.08.2012 JP 2012185868

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.07.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

KATADA, HITOSHI;
KADONO, SHOJIRO;
MIMOTO, FUTA y
IGAWA, TOMOYUKI

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Variante de la región Fc específica de FcγRIIb

Campo de la técnica

La presente invención se refiere a regiones de la IgG1 de humano según se define en las reivindicaciones. De manera más general, se describen en la presente memoria variantes de la región Fc introducidas con una o varias alteraciones de aminoácidos en una región Fc de anticuerpo, que tienen realzada la actividad de fijación al FcγRIIb y/o realzada la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R), en comparación con una región Fc en la cual no se han introducido las una o varias alteraciones de aminoácido; polipéptidos que comprenden las variantes de la región Fc; y composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos.

Antecedentes de la técnica

Los anticuerpos están acaparando la atención como fármacos ya que son muy estables en la sangre y tienen pocos efectos secundarios (documentos 1 y 2 que no son patentes). Casi todos los anticuerpos terapéuticos que en la actualidad se encuentran en el mercado son anticuerpos de humano de la subclase IgG1. Una de las funciones conocidas de los anticuerpos de la clase IgG es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (de aquí en adelante se denominará actividad CCDA) (documento 3 que no es patente). Para que un anticuerpo muestre actividad CCDA, la región Fc de anticuerpo debe fijarse a un receptor de Fcγ (de aquí en adelante denominado FcγR) que es un receptor fijador de anticuerpos presente sobre la superficie de células efectoras, tales como los linfocitos citolíticos, los linfocitos citolíticos naturales y los macrófagos activados.

En los humanos, las isoformas FcγRIa (CD64A), FcγRIIa (CD32A), FcγRIIb (CD32B), FcγRIIIa (CD16A) y FcγRIIIb (CD16B) se ha descrito que forman la familia de proteínas FcγR, y también se han descrito los correspondientes alotipos (documento 7 que no es patente). FcγRIa, FcγRIIa, y FcγRIIIa se denominan FcγR activadores ya que tienen funciones de activación inmunitaria, y FcγRIIb se denomina FcγR inhibidor porque tiene funciones inmunosupresoras (documento 8 que no es patente).

En la fijación entre la región Fc y el FcγR se ha demostrado que son importantes varios restos aminoacídicos en la región bisagra y el dominio CH2 del anticuerpo, y un polisacárido unido a la Asn de la posición 297 (numeración EU) unido al dominio CH2 (documentos 4, 5 y 6 que no son patente). Hasta ahora se han estudiado diferentes variantes que tienen propiedades de fijación al FcγR, principalmente anticuerpos a los que se han introducido mutaciones en estos sitios; y se han obtenido variantes de la región Fc que tienen mayor actividad de fijación por los FcγR activadores (documentos de patente 1, 2, 3 y 4).

Cuando el FcγR activador está interconectado con un complejo inmunitario, fosforila los motivos tirosínicos de activación del receptor inmunitario (ITAM) contenidos en el dominio intracelular o en la cadena γ común de FcR (un compañero de interacción), activa un transductor de señal SYK y desencadena la respuesta inmunitaria inflamatoria al iniciar una cascada de señales de activación (documento 9 que no es patente).

FcγRIIb es el único FcγR expresado en los linfocitos B (documento 10 que no es patente). Se ha descrito que la interacción de la región Fc de anticuerpo con el FcγRIIb suprime la respuesta inmunitaria primaria de los linfocitos B (documento 11 que no es patente). Además, se ha descrito que, cuando el FcγRIIb de los linfocitos B y un receptor de linfocitos B (BCR) quedan conectados a través de un complejo inmunitario en la sangre, se suprime la activación de los linfocitos B y se suprime la producción de anticuerpos desde los linfocitos B (documento 12 que no es patente). En esta transducción de señales inmunosupresora mediada por BCR y FcγRIIb se necesita el motivo tirosínico de inhibición del receptor inmunitario (ITIM) contenido en el dominio intracelular de FcγRIIb (documentos 13 y 14 que no son patentes). Cuando el ITIM se fosforila tras la señalización, se recluta la 5-fosfatasa de polifosfato de inositol que contiene SH2 (SHIP), se inhibe la transducción de otras cascadas de señales del FcγR activador y se suprime la respuesta inmunitaria inflamatoria (documento 15 que no es patente). Por otra parte, se ha descrito que la agregación solo de FcγRIIb suprime transitoriamente la entrada de calcio debido a la conexión con el BCR y la proliferación de los linfocitos B de una manera independiente de BCR sin inducir la apoptosis de linfocitos B productores de IgM (documento 16 que no es patente).

Por otra parte, el FcγRIIb también se expresa en las células dendríticas, en los macrófagos, en los neutrófilos activados, en los mastocitos y en los basófilos. El FcγRIIb inhibe las funciones del FcγR activador tal como la fagocitosis y la liberación de citocinas inflamatorias en estas células, y suprime las respuestas inmunitarias inflamatorias (documento 8 que no es patente).

La importancia de las funciones inmunosupresoras del FcγRIIb se ha elucidado hasta la fecha mediante estudios que utilizan ratones con genosupresión del FcγRIIb. Se ha publicado que, en los ratones con genosupresión del FcγRIIb, la inmunidad humoral no está regulada adecuadamente (documento 17 que no es patente), está incrementada la sensibilidad a la artritis inducida por colágeno (AIC) (documento 18 que no es patente), muestran síntomas de tipo lupus y se presentan síntomas del tipo síndrome de Goodpasture (documento 19 que no es patente).

Por otra parte, se ha descrito que la regulación defectuosa del FcγRIIb está relacionada con enfermedades autoinmunitarias humanas. Por ejemplo, se ha descrito que los polimorfismos genéticos en la región transmembranaria y la región del promotor del FcγRIIb están relacionados con la frecuencia del desarrollo del lupus eritematoso diseminado (LED) (documentos 20, 21, 22, 23 y 24 que no son patentes), y la disminución de la expresión del FcγRIIb en la superficie de los linfocitos B en los pacientes con el LED (documentos 25 y 26 que no son patentes).

A partir de los modelos de ratón y los hallazgos clínicos tal cual, se considera que el FcγRIIb se encarga de controlar las enfermedades autoinmunitarias y las enfermedades inflamatorias a través de su intervención sobre todo con los linfocitos B, y es una diana molecular prometedora para controlar las enfermedades autoinmunitarias y las enfermedades inflamatorias.

La IgG1, utilizada principalmente como un anticuerpo terapéutico disponible en el mercado, se sabe que se fija no solo al FcγRIIb, sino también al FcγR activador con fuerza (documento 27 que no es patente). Es posible desarrollar anticuerpos terapéuticos que tienen mayores propiedades inmunosupresoras que las de IgG1 mediante el uso de una región Fc con realce de la fijación al FcγRIIb, o realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb con respecto al FcγR activador. Por ejemplo, se ha sugerido que el uso de un anticuerpo que tiene una región variable que se fija al BCR y una Fc con mejor fijación al FcγRIIb puede inhibir la activación de los linfocitos B (documento 28 que no es patente). Se ha descrito que la interconexión entre el FcγRIIb de los linfocitos B y la IgE fijada a un receptor de linfocitos B suprime la diferenciación de los linfocitos B en las células plasmáticas, lo que da como resultado la supresión de la producción de IgE; y en los ratones a los que se han transplantado CMSP humanas, se mantiene la concentración de IgG e IgM de humano mientras que disminuye la concentración de la IgE de humano (documento 29 que no es patente). Además de IgE, se ha descrito que cuando el FcγRIIB y la CD79b, que es una molécula que forma parte de un complejo del receptor de los linfocitos B, quedan conectadas mediante un anticuerpo, se suprime la proliferación de los linfocitos B *in vitro*, y los síntomas de la artritis se alivian en el modelo de artritis por colágeno (documento 30 que no es patente).

Además de los linfocitos B, en los mastocitos se ha descrito que la conexión de FcεRI y FcγRIIb mediante moléculas, en las que la porción Fc de una IgG con realce de la fijación al FcγRIIb se fusiona a la porción Fc de una IgE que se fija al FcεRI (el receptor de IgE), provoca la fosforilación de FcγRIIb, gracias a lo cual se suprime la entrada del calcio dependiente de FcεRI. Esto sugiere que se puede inhibir la desgranulación mediante la estimulación del FcγRIIb mediante el realce de la fijación al FcγRIIb (documento 31 que no es patente).

De acuerdo con esto, un anticuerpo que tiene una Fc con realce de la actividad de fijación al FcγRIIb se sugiere que es prometedor como agente terapéutico contra las enfermedades inflamatorias, tales como las enfermedades autoinmunitarias.

Además, se ha descrito que la activación de los macrófagos y de las células dendríticas mediante el receptor 4 de tipo *toll* debido a que se suprime la estimulación por LPS en presencia de un complejo inmunitario anticuerpo-antígeno, y este efecto también se sugiere que son acciones del complejo inmunitario a través del FcγRIIb (documentos 32 y 33 que no son patentes). Por lo tanto, el uso de los anticuerpos con realce de la fijación al FcγRIIb se espera que permita que mejoren las acciones supresoras de las señales de activación dependientes de TLR; así pues, se ha sugerido que tales anticuerpos son prometedores como agentes terapéuticos contra las enfermedades inflamatorias, tales como las enfermedades autoinmunitarias.

Además, se ha sugerido que los mutantes con realce de la fijación al FcγRIIb son agentes terapéuticos prometedores contra el cáncer, así como agentes terapéuticos contra las enfermedades inflamatorias, tales como las enfermedades autoinmunitarias. Hasta ahora, se ha encontrado que el FcγRIIb desempeña una función importante en la actividad agonista de los anticuerpos agonistas contra la superfamilia del receptor del TNF. Específicamente, se ha sugerido que se necesita la interacción con FcγRIIb para la actividad agonista de los anticuerpos contra CD40, DR4, DR5, CD30 y CD137, que están incluidas en la familia del receptor del TNF (documentos 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40 que no son patente). El documento 34 que no es patente demuestra que el uso de anticuerpos con realce de la fijación al FcγRIIb realza el efecto antitumoral de los anticuerpos anti-CD40. De acuerdo con esto, los anticuerpos con realce de la fijación al FcγRIIb se espera que tengan el efecto de realzar la actividad agonista de los anticuerpos agonistas, entre ellos, los anticuerpos contra la superfamilia del receptor del TNF.

Además, se ha demostrado que se suprime la proliferación celular con el uso de un anticuerpo que reconoce Kit, un tipo de receptor con actividad tirosina cinasa (RTK, por su nombre en inglés), para interconectar FcγRIIb y Kit en las células que expresan Kit. Se han descrito efectos similares incluso en los casos en los que Kit está activado constitutivamente y tiene mutaciones que provocan la oncogénesis (documento 41 que no es patente). Por lo tanto, se espera que el uso de anticuerpos con realce de la fijación al FcγRIIb puedan realzar los efectos inhibidores en las células que expresan el RTK que tiene mutaciones que lo activan constitutivamente.

Se han descrito anticuerpos que tienen una Fc con realce de la actividad de fijación al FcγRIIb (documento 28 que no es patente). En este documento, se realzó la actividad de fijación al FcγRIIb al añadir alteraciones tales como S267E/L328F, G236D/S267E y S239D/S267E a una región Fc de anticuerpo. Entre ellas, el anticuerpo en el que se introdujo la mutación S267E/L328F es el que se fija con más fuerza al FcγRIIb y mantiene el mismo nivel de fijación al FcγRIa y al FcγRIIa de tipo H en los que un resto de Pro de la posición 131 de FcγRIIa es His como el de una IgG1

que se produce de forma natural. Sin embargo, otro informe demuestra que esta alteración mejora varios cientos de veces la fijación al FcγRIIa de tipo R en el que un resto en la posición 131 de FcγRIIa es His, hasta el mismo nivel de fijación al FcγRIIb, lo que significa que la selectividad de fijación por el FcγRIIb no mejora en comparación con el FcγRIIa de tipo R (documento 5 de patente).

Solo el efecto de realzar la fijación al FcγRIIa y no el realce de la fijación al FcγRIIb se considera que influye en las células tales como las plaquetas que expresan el FcγRIIa y que no expresan el FcγRIIb (documento 8 que no es patente). Por ejemplo, el grupo de pacientes a los que se les administró el bevacizumab, un anticuerpo contra el VEGF, se sabe que tienen un incremento del riesgo de tromboembolia (documento 42 que no es patente). Por otra parte, se ha observado la tromboembolia de una manera similar en las pruebas de desarrollo clínico de anticuerpos contra el ligando de CD40, y se interrumpió el estudio clínico (documento 43 que no es patente). En ambos casos de estos anticuerpos, los estudios posteriores con modelos animales y similares han sugerido que los anticuerpos administrados agregan las plaquetas mediante la fijación al FcγRIIa de las plaquetas y forman coágulos de sangre (documentos 44 y 45 que no son patentes). En el lupus eritematoso diseminado, que es una enfermedad autoinmunitaria, las plaquetas se activan a través de un mecanismo dependiente de FcγRIIa y se ha descrito que la activación plaquetaria se correlaciona con la intensidad de los síntomas (documento 46 que no es patente). La administración de un anticuerpo con realce de la fijación al FcγRIIa a tales pacientes que ya tienen un riesgo elevado de desarrollar tromboembolia incrementará el riesgo de desarrollar tromboembolia, por lo que es muy peligroso.

Además, se ha descrito que los anticuerpos con mejor fijación al FcγRIIa potencian la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (FCDA) mediada por macrófagos (documento 47 que no es patente). Cuando los antígenos a los que se fijarán los anticuerpos son fagocitados por los macrófagos, se considera que los propios anticuerpos también se fagocitan al mismo tiempo. Cuando los anticuerpos se administran como fármacos, se supone que los fragmentos peptídicos procedentes de los anticuerpos administrados probablemente también se presentan como un antígeno, a tenor de lo cual se incrementa el riesgo de producción de anticuerpos contra los anticuerpos terapéuticos (anticuerpos antiterapéuticos). Más específicamente, el realce de la fijación al FcγRIIa incrementará el riesgo de la producción de anticuerpos contra los anticuerpos terapéuticos, y esto hará disminuir notablemente su valor como fármacos. Además, se ha sugerido que el FcγRIIb en las células dendríticas contribuye a la tolerancia periférica al inhibir la activación de las células dendríticas provocada por los complejos inmunitarios formados entre los antígenos y los anticuerpos, o al suprimir la presentación del antígeno a los linfocitos T mediante los receptores de Fcγ activadores (documento 48 que no es patente). Dado que el FcγRIIa también se expresa en las células dendríticas, cuando los anticuerpos que tienen una Fc con realce de la fijación selectiva por el FcγRIIb se utilizan como fármacos, los antígenos no se presentan con facilidad en las células dendríticas y similares debido al realce de la fijación selectiva al FcγRIIb, y se puede reducir relativamente el riesgo de producción de los anticuerpos contra el fármaco. Tales anticuerpos también pueden ser útiles en este sentido.

Más específicamente, el valor como fármacos se reducirá considerablemente cuando se realza la fijación al FcγRIIa, lo que conduce a un incremento del riesgo de formación de trombos por medio de la agregación plaquetaria y a un incremento del riesgo de producción de anticuerpos antiterapéuticos debido a un incremento de la inmunogenia.

Desde tal punto de vista, la variante de Fc anteriormente mencionada que se fija mejor al FcγRIIb muestra un realce notable de la fijación al FcγRIIa de tipo R en comparación con la de IgG1 que se produce de forma natural. Así pues, se reduce considerablemente su valor como fármaco para los pacientes portadores del FcγRIIa de tipo R. Los tipos H y R del FcγRIIa se observan en los caucásicos y los afroamericanos con aproximadamente la misma frecuencia (documentos 49 y 50 que no son patentes). Por lo tanto, cuando se utilizó esta variante de Fc para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, será muy pequeño el número de pacientes que la pueden utilizar con seguridad mientras disfrutan de sus efectos como fármaco.

Por otra parte, en las células dendríticas carentes de FcγRIIb o en las células dendríticas en las que se inhibe la interacción entre el FcγRIIb y la porción Fc de anticuerpo mediante un anticuerpo anti-FcγRIIb, se ha descrito que las células dendríticas maduran (documentos 51 y 52 que no son patentes). Este informe sugiere que el FcγRIIb suprime activamente la maduración de las células dendríticas en un estado estacionario cuando la inflamación y similares no tienen lugar, y la activación tampoco tiene lugar. El FcγRIIa se expresa en la superficie de las células dendríticas, además del FcγRIIb; por lo tanto, incluso aunque se realce la fijación al FcγRIIb inhibidor y si también se realza la fijación al FcγR activador, tal como FcγRIIa, se puede promover que el resultado sea la maduración de las células dendríticas. Más específicamente, se considera que el realce de no solo la actividad de fijación al FcγRIIb, sino también de la relación de la actividad de fijación al FcγRIIb con respecto a la actividad de fijación al FcγRIIa, es importante para dar a conocer anticuerpos con una acción inmunosupresora.

Así pues, al considerar la generación de fármacos que utilizan la acción inmunosupresora dependiente de la fijación al FcγRIIb, hay una necesidad de una variante de Fc que no solo tiene realzada la actividad de fijación al FcγRIIb, sino que también se fija a ambos FcγRIIa, alotipos de tipo H y R, lo que se mantiene a un nivel similar o se debilita a un nivel más bajo que el de la IgG1 que se produce en la naturaleza.

Mientras tanto, hasta la fecha se han descrito casos donde se introdujeron alteraciones de aminoácidos en la región Fc para incrementar la selectividad de fijación por el FcγRIIb (documento 53 que no es patente). Sin embargo, todas las variantes que se dice que tienen realzada la selectividad por el FcγRIIb tal y como se describe en este documento

muestran una disminución de la fijación al FcγRIIb con respecto a la de una IgG1 que se produce en la naturaleza. Por lo tanto, se considera que es difícil para estas variantes inducir realmente una reacción inmunosupresora dependiente de FcγRIIb más fuertemente que la de IgG1.

Por otra parte, ya que el FcγRIIb desempeña una función importante en los anticuerpos agonistas mencionados más arriba, se espera que el realce de su actividad de fijación mejore la actividad agonista. Sin embargo, cuando la fijación al FcγRIIa se realza de igual forma, se mostrarán actividades inesperadas, tales como actividad CCDA y actividad FCDA, y esto puede provocar efectos secundarios. También desde tal punto de vista, es preferible ser capaces de realzar de forma selectiva la actividad de fijación al FcγRIIb.

A partir de estos resultados, al producir anticuerpos terapéuticos para ser utilizados en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y el cáncer mediante el uso del FcγRIIb, es importante que, en comparación con las de una IgG que se produce de forma natural, se mantenga o se disminuya la actividad de fijación a ambos alotipos de FcγRIIa, y que se realce la fijación al FcγRIIb. Sin embargo, el FcγRIIb comparte una identidad de secuencia del 93% en la región extracelular con la del FcγRIIa, que es uno de los FcγR activadores, y son muy similares desde el punto de vista estructural. Hay alotipos de FcγRIIa, tipo H y tipo R, en los que el aminoácido de la posición 131 es His (tipo H) o Arg (tipo R) y cada uno de ellos reacciona de manera diferente con los anticuerpos (documento 54 que no es patente). Por lo tanto, el problema difícil puede ser la producción de una variante de la región Fc con realce de la fijación selectiva al FcγRIIb en comparación con cada alotipo de FcγRIIa, lo que implica diferenciar secuencias muy homólogas entre FcγRIIa y FcγRIIb. De hecho, hasta ahora no se han obtenido variantes que tengan una suficiente actividad de fijación y selectividad por el FcγRIIb. En el documento 5 de patente se informa de las variantes con realce de la actividad de fijación al FcγRIIb; sin embargo, el grado de realce es bajo y hay demanda de desarrollo de variantes que tengan propiedades similares a las descritas más arriba.

Documentos de la técnica anterior

[Documentos de patente]

[Documento 1 de patente] solicitud de patente internacional WO 2000/42072

[Documento 2 de patente] solicitud de patente internacional WO 2006/019447

[Documento 3 de patente] solicitud de patente internacional WO 2004/99249

[Documento 4 de patente] solicitud de patente internacional WO 2004/29207

[Documento 5 de patente] patente de los EE. UU. US2009/0136485

[Documentos que no son patentes]

[Documento 1 que no es patente] *Nat Biotechnol*, 23, 1073-1078, 2005

[Documento 2 que no es patente] *Eur J Pharm Biopharm*., 59 (3), 389-96, 2005

[Documento 3 que no es patente] *Chem Immunol*, 65, 88-110, 1997.

[Documento 4 que no es patente] *J Biol Chem*, 276, 16478-16483, 2001.

[Documento 5 que no es patente] *Eur J Immunol* 23, 1098-1104, 1993.

[Documento 6 que no es patente] *Immunology*, 86, 319-324, 1995.

[Documento 7 que no es patente] *Immunol Lett*, 82, 57-65, 2002.

[Documento 8 que no es patente] *Nat Rev Immunol* 10, 328-343, 2010.

[Documento 9 que no es patente] *Nat Rev Immunol* 8, 34-47, 2008.

[Documento 10 que no es patente] *Eur J Immunol* 19, 1379-1385, 1989.

[Documento 11 que no es patente] *J Exp Med* 129, 1183-1201, 1969.

[Documento 12 que no es patente] *Immunol Lett*, 88, 157-161, 2003.

[Documento 13 que no es patente] *Science*, 256, 1808-1812, 1992.

[Documento 14 que no es patente] *Nature*, 368, 70-73, 1994.

[Documento 15 que no es patente] *Science*, 290, 84-89, 2000.

[Documento 16 que no es patente] *J. Immunol.*, 181, 5350-5359, 2008.

[Documento 17 que no es patente] *J Immunol*, 163, 618-622, 1999.

[Documento 18 que no es patente] *J Exp Med* , 189, 187-194, 1999.

[Documento 19 que no es patente] *J Exp Med* , 191, 899-906, 2000.

[Documento 20 que no es patente] *Hum. Genet.*, 117, 220-227, 2005.

[Documento 21 que no es patente] *J Biol Chem*, 282, 1738-1746, 2007.

[Documento 22 que no es patente] *Arthritis Rheum*., 54, 3908-3917, 2006.

[Documento 23 que no es patente] *Nat Med*, 11, 1056-1058, 2005.

[Documento 24 que no es patente] *J Immunol*, 176, 5321-5328, 2006.

[Documento 25 que no es patente] *J Exp Med* , 203, 2157-2164, 2006.

[Documento 26 que no es patente] *J Immunol.,* 178, 3272-3280, 2007.

[Documento 27 que no es patente] *Blood*, 113, 3716-3725, 2009.

[Documento 28 que no es patente] *Mol Immunol*, 45, 3926-3933, 2008.

[Documento 29 que no es patente] *J Allergy Clin Immunol*, 2012, 129: 1102-1115

[Documento 30 que no es patente] *Arthritis Rheum*., 62, 1933-1943, 2010.

[Documento 31 que no es patente] *Immunol Let*, doi: 10.1016/j.imlet.2012.01.008

[Documento 32 que no es patente] *J. Immunol*, 2009, 183: 4509-4520

[Documento 33 que no es patente] *J. Immunol*, 2009, 182: 554-562

[Documento 34 que no es patente] *Science*, 333, 1030-1034, 2011.

[Documento 35 que no es patente] *Cancer Cell 19*, 101-113, 2011.

[Documento 36 que no es patente] *J. Clin. Invest.*, 122 (3), 1066-1075, 2012.

[Documento 37 que no es patente] *J Immunol,* 171, 562, 2003.

[Documento 38 que no es patente] *Blood*, 108, 705, 2006.

[Documento 39 que no es patente] *J Immunol,* 166, 4891, 2001.

[Documento 40 que no es patente] doi: 10.1073/pnas.1208698109

[Documento 41 que no es patente] *Immunol Let*, 2002, 143: 28-33

[Documento 42 que no es patente] *J Natl Cancer Inst*., 99, 1232-1239, 2007.

[Documento 43 que no es patente] *Arthritis Rheum*., 48, 719-727, 2003.

[Documento 44 que no es patente] *J Thromb Haemost*, 7, 171-181, 2008.

[Documento 45 que no es patente] *J Immunol*, 185, 1577-1583, 2010.

[Documento 46 que no es patente] *Sci Transl Med*, vol 2, número 47, 47-63, 2010

[Documento 47 que no es patente] *Mol Cancer Ther, 7*, 2517-2527, 2008.

[Documento 48 que no es patente] *J. Immunol*, 2007, 178: 6217-6226

[Documento 49 que no es patente] *J Clin Invest*, 97, 1348-1354, 1996.

[Documento 50 que no es patente] *Arthritis Rheum*., 41, 1181-1189, 1998.

[Documento 51 que no es patente] *J Clin Invest,* 115, 2914-2923, 2005.

[Documento 52 que no es patente] *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 2910-2915, 2005.

[Documento 53 que no es patente] *Mol Immunol*, 40, 585-593, 2003.

[Documento 54 que no es patente] *J Exp Med*, 172, 19-25, 1990.

Compendio

[Problemas que se solucionan con la invención]

La presente invención se llevó a cabo en vista de las circunstancias de más arriba. Un objeto de la presente invención es dar a conocer las realizaciones que están caracterizadas en las reivindicaciones. Así pues, se da a conocer la región Fc de la IgG1 de humano por introducción de una o varias alteraciones de aminoácidos en una región Fc de anticuerpo, en donde dicha variante tiene realzada la actividad de fijación al FcγRIIb y/o realzada la selectividad de fijación por el FcγRIIb (tipo R), en comparación con cuando no se ha introducido ninguna alteración de aminoácidos en la región Fc; un polipéptido que comprende la variante de la región Fc; y una composición farmacéutica que contiene el polipéptido.

[Medios para solucionar los problemas]

Los presentes inventores llevaron a cabo una investigación dedicada por entero a: una variante de la región Fc con realce de la fijación al FcγRIIb y realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R), en comparación con cuando la región Fc no está alterada por la introducción de una o varias alteraciones de aminoácidos en la región Fc; y un polipéptido que comprende la variante de la región Fc. Como resultado, los presentes inventores encontraron que se realza la actividad de fijación al FcγRIIb y/o se realza la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con al FcγRIIa (tipo R) al combinar una variante de la región Fc en la que el aminoácido de la posición 238 (numeración EU) de la región Fc se ha alterado con otra alteración o alteraciones de aminoácidos.

Más específicamente, la presente invención se define mediante las reivindicaciones y se refiere a lo siguiente:

[1] Una región Fc de la IgG1 de humano que comprende cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos de (a) a (x):

(a) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(b) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp o Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(c) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 332 es Thr, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(d) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Gly o Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(e) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 332 es Thr, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(f) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 332 es Thr, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(g) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 327 es Gly, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(h) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, y el aminoácido de la posición 271 es Gly, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(i) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(j) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 396 es Met o Leu, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(k) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(l) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(m) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, y el aminoácido de la posición 271 es Gly, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(n) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, y el aminoácido de la posición 296 es Asp, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(o) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 267 es Ala o Gly, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(p) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 396 es Met o Leu, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(q) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 327 es Gly, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 396 es Met, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(r) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 272 es Asp, y el aminoácido de la posición 296 es Asp, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(s) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 272 es Pro, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(t) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 272 es Pro, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(u) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la

posición 268 es Glu, y el aminoácido de la posición 271 es Gly, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(v) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 267 es Gly, el aminoácido de la posición 268 es Asp, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(w) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 272 es Asp, y el aminoácido de la posición 296 es Asp, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc; y

(x) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, y el aminoácido de la posición 296 es Asp, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc.

en donde (i) el valor para [valor de KD para el FcγRIIa (tipo R) de un polipéptido que comprende dicha región Fc de la IgG1 de humano]/[valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende dicha región Fc de la IgG1 de humano] es 10.0 o mayor, y (ii) el valor para [valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende una región Fc de SEQ ID n.º 11]/[valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende dicha región Fc de la IgG1 de humano] es 15.0 o mayor.

[2] La región Fc de la IgG1 de humano de [1], en donde el valor para [valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende una región Fc de SEQ ID n.º 11]/[valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende dicha región Fc de la IgG1 de humano] es 50.0 o más, o 100.0 o más.

[3] La región Fc de la IgG1 de humano de [1] o [2], en donde el valor para [valor de KD para el FcγRIIa (tipo R) de un polipéptido que comprende dicha región Fc de la IgG1 de humano]/[valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende dicha región Fc de la IgG1 de humano] es 20.0 o mayor.

[4] La región Fc de la IgG1 de humano de cualquiera de [1] a [3], que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID n.ºs 43 a 68, SEQ ID n.º 70, SEQ ID n.º 71 y las SEQ ID n.ºs 75 a 77.

[5] Un polipéptido que comprende al menos dos regiones Fc de la IgG1 de humano de cualquiera de [1] a [4], en donde las dos regiones Fc de la IgG1 de humano están asociadas.

[6] El polipéptido de [5], en donde la secuencia de aminoácidos de las dos regiones Fc de la IgG1 de humano asociadas en el polipéptido son (a) iguales o (b) diferentes.

[7] El polipéptido de [6(b)], en donde la secuencia de aminoácidos de las dos regiones Fc de la IgG1 de humano asociadas tienen diferentes aminoácidos en al menos una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones 235, 236, 237, 238 y 239 de acuerdo con la numeración EU en la región Fc de la IgG1 de humano.

[8] El polipéptido de [7], en donde una de la secuencia de aminoácidos de las dos regiones Fc de la IgG1 de humano asociadas es una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido seleccionado de Asp, Gln, Glu o Thr en la posición del aminoácido 235, Asn en la posición del aminoácido 236, Phe o Trp en la posición del aminoácido 237, Glu, Gly, o Asn en la posición del aminoácido 238, y Asp o Glu en la posición del aminoácido 239 de acuerdo con la numeración EU.

[9] El polipéptido de cualquiera de [5] a [8], en donde el polipéptido que comprende las regiones Fc de la IgG1 de humano es un anticuerpo de tipo IgG o una molécula de la proteína de fusión a Fc.

[10] Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de cualquiera de [5] a [9].

También se describe en la presente memoria lo siguiente:

[1] una variante de la región Fc en la que el aminoácido de la posición 238 de acuerdo con la numeración EU y al menos un aminoácido seleccionado de los de las posiciones 233, 234, 235, 237, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 271, 272, 274, 296, 326, 327, 330, 331, 332, 333, 334, 355, 356, 358, 396, 409 y 419 de acuerdo con la numeración EU han sido convertidos en aminoácidos, en donde la actividad de fijación de la variante a los receptores de Fcγ [valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende una región Fc en la cual no se ha introducido ninguna alteración de aminoácido]/[valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende la variante de la región Fc] tiene un valor que es 15.0 o mayor;

[2] la variante de la región Fc de [1], en donde los aminoácidos de las posiciones 238, 268 y 271 de acuerdo con la numeración EU han sido convertidos en otros aminoácidos y, además, al menos un aminoácido seleccionado de los

aminoácidos de las posiciones 233, 237, 264, 267, 272, 296, 327, 330, 332 y 396 de acuerdo con la numeración EU han sido convertidos en otros aminoácidos;

[3] una variante de la región Fc cuyo aminoácido de la posición 238 de acuerdo con la numeración EU es Asp, y que comprende al menos un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en Asp en la posición del aminoácido 233, Tyr en la posición del aminoácido 234, Phe en la posición del aminoácido 235, Asp en la posición del aminoácido 237, Ile en la posición del aminoácido 264, Glu en la posición del aminoácido 265, Phe, Leu o Met en la posición del aminoácido 266, Ala, Glu, Gly o Gln en la posición del aminoácido 267, Asp, Gln o Glu en la posición del aminoácido 268, Asp en la posición del aminoácido 269, Gly en la posición del aminoácido 271, Asp, Phe, Ile, Met, Asn, Pro o Gln en la posición del aminoácido 272, Gln en la posición del aminoácido 274, Asp o Phe en la posición del aminoácido 296, Ala o Asp en la posición del aminoácido 326, Gly en la posición del aminoácido 327, Lys, Arg o Ser en la posición del aminoácido 330, Ser en la posición del aminoácido 331, Lys, Arg, Ser o Thr en la posición del aminoácido 332, Lys, Arg, Ser o Thr en la posición del aminoácido 333, Arg, Ser o Thr en la posición del aminoácido 334, Ala o Gln en la posición del aminoácido 355, Glu en la posición del aminoácido 356, Met en la posición del aminoácido 358, Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr en la posición del aminoácido 396, Arg en la posición del aminoácido 409, y Glu en la posición del aminoácido 419, en donde la actividad de fijación de la variante a los receptores de Fcγ [valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende una región Fc en la cual no se ha introducido ninguna alteración de aminoácido]/[valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende la variante de la región Fc] tiene un valor que es 15.0 o mayor;

[4] la variante de la región Fc de [3], en donde el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp o Glu, y el aminoácido de la posición 271 es Gly, de acuerdo con la numeración EU, y en donde la variante de la región Fc comprende además al menos un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos que consiste en Asp en la posición del aminoácido 233, Asp en la posición del aminoácido 237, Ile en la posición del aminoácido 264, Ala o Gly en la posición del aminoácido 267, Asp o Pro en la posición del aminoácido 272, Asp en la posición del aminoácido 296, Gly en la posición del aminoácido 327, Arg en la posición del aminoácido 330, Thr en la posición del aminoácido 332, y Leu o Met en la posición del aminoácido 396;

[5] la variante de la región Fc de cualquiera de [1] a [4], en donde el valor para [valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende una región Fc en la cual no se ha introducido ninguna alteración de aminoácido]/[valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende una variante de la región Fc] es 50.0 o mayor;

[6] la variante de la región Fc de cualquiera de [1] a [4], en donde el valor para [valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende una región Fc en la cual no se ha introducido ninguna alteración de aminoácido]/[valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende una variante de la región Fc] es 100.0 o mayor;

[7] la variante de la región Fc de cualquiera de [1] a [6], en donde el valor para [valor de KD para el FcγRIIa (tipo R) de un polipéptido que comprende una variante de la región Fc]/[valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende una variante de la región Fc] es 10.0 o mayor;

[8] la variante de la región Fc de cualquiera de [1] a [6], en donde el valor para [valor de KD para el FcγRIIa (tipo R) de un polipéptido que comprende una variante de la región Fc]/[valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende una variante de la región Fc] es 20.0 o mayor;

[9] La variante de la región Fc de cualquiera de [1] a [8], en donde la variante de la región Fc comprende cualquiera del siguiente conjunto de alteraciones de aminoácido de (a) a (x):

(a) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 268, 271, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(b) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 268, 271, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(c) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 268, 271, 296, 330 y 332 (numeración EU) de una región Fc;

(d) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268, 271 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(e) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 267, 268, 271, 296, 330 y 332 (numeración EU) de una región Fc;

(f) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 267, 268, 271, 296, 330 y 332 (numeración EU) de una región Fc;

(g) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 268, 271, 296, 327 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(h) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268 y 271 (numeración EU) de una región Fc;

(i) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268, 271, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(j) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268, 271, 296, 330 y 396 (numeración EU) de una región Fc;

(k) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 264, 267, 268, 271 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(l) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 264, 267, 268, 271, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(m) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 264, 267, 268 y 271 (numeración EU) de una región Fc;

(n) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 264, 267, 268, 271 y 296 (numeración EU) de una región Fc;

(o) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 267, 268, 271, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(p) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268, 271, 330 y 396 (numeración EU) de la región Fc;

(q) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268, 271, 296, 327, 330 y 396 (numeración EU) de una región Fc;

(r) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268, 271, 272 y 296 (numeración EU) de una región Fc;

(s) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 264, 267, 268, 271, 272 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(t) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 264, 267, 268, 271, 272, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(u) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 264, 267, 268 y 271 (numeración EU) de una región Fc;

(v) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 267, 268, 271, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(w) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 264, 267, 268, 271, 272 y 296 (numeración EU) de una región Fc; y

(x) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 264, 267, 268, 271 y 296 (numeración EU) de una región Fc;

[10] la variante de la región Fc de cualquiera de [1] a [8], en donde la variante de la región Fc comprende cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos de (a) a (x):

(a) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(b) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp o Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(c) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 332 es Thr, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(d) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Gly o Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(e) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 332 es Thr, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(f) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 332 es Thr, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(g) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 327 es Gly, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(h) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, y el aminoácido de la posición 271 es Gly, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(i) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(j) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 396 es Met o Leu, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(k) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(l) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(m) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, y el aminoácido de la posición 271 es Gly, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(n) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, y el aminoácido de la posición 296 es Asp, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(o) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 267 es Ala o Gly, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(p) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 396 es Met o Leu, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(q) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 327 es Gly, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 396 es Met, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(r) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 272 es Asp, y el aminoácido de la posición 296 es Asp, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(s) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 272 es Pro, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(t) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 272 es Pro, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(u) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, y el aminoácido de la posición 271 es Gly, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(v) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 267 es Gly, el aminoácido de la posición 268 es Asp, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(w) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 272 es Asp, y el aminoácido de la posición 296 es Asp, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc; y

(x) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, y el aminoácido de la posición 296 es Asp, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

[11] una variante de la región Fc que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada de entre las SEQ ID n.os 43 a 68, SEQ ID n.º 70, SEQ ID n.º 71 y las SEQ ID n.os 75 a 77;

[12] un polipéptido que comprende al menos dos variantes de la región Fc de cualquiera de [1] a [11], en donde las dos variantes de la región Fc están asociadas;

[13] el polipéptido de [12], en donde las secuencias de aminoácidos de las dos variantes de la región Fc asociadas en el polipéptido son iguales;

[14] el polipéptido de [12], en donde las secuencias de aminoácidos de las dos variantes de la región Fc asociadas en el polipéptido son diferentes;

[15] el polipéptido de [14], en donde las secuencias de aminoácidos de las dos variantes de la región Fc asociadas tienen diferentes aminoácidos en al menos una posición de aminoácido seleccionada de las posiciones 235, 236, 237, 238 y 239 de acuerdo con la numeración EU en la variante de la región Fc;

[16] El polipéptido de [15], en donde una de las secuencias de aminoácidos de las dos variantes de la región Fc asociadas es una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido seleccionado de Asp, Gln, Glu o Thr en la posición del aminoácido 235, Asn en la posición del aminoácido 236, Phe o Trp en la posición del aminoácido 237, Glu, Gly, o Asn en la posición del aminoácido 238, y Asp o Glu en la posición del aminoácido 239 de acuerdo con la numeración EU;

[17] el polipéptido de cualquiera de [12] a [16], en donde el polipéptido que comprende la variante de la región Fc es un anticuerpo de tipo IgG;

[18] el polipéptido de cualquiera de [12] a [16], en donde el polipéptido que comprende la variante de la región Fc es una molécula de la proteína de fusión a Fc; y

[19] Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de cualquiera de [12] a [18].

Además, también se describe en la presente memoria un método para realzar la actividad de fijación de una región Fc al FcγRIIb y para realzar la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R), al introducir una o varias alteraciones de aminoácido en la región Fc descritas en la presente memoria. También se describe en la presente memoria un método para suprimir la producción de anticuerpos contra un polipéptido que contiene una región Fc, al introducir una o varias alteraciones de aminoácido descritas en la presente memoria en la región Fc.

También se describe en la presente memoria un agente terapéutico o preventivo contra las enfermedades inflamatorias inmunitarias que comprende un polipéptido descrito en la presente memoria. Además, también se describe en la presente memoria un método para tratar o prevenir las enfermedades inflamatorias inmunitarias, que comprende la etapa de administrar un polipéptido descrito en la presente memoria a un sujeto. Además, también se describe en la presente memoria un kit para ser usado en el método descrito en la presente memoria para tratar o prevenir las enfermedades inflamatorias inmunitarias, que comprende un polipéptido descrito en la presente memoria. También se describe en la presente memoria el uso de un polipéptido descrito en la presente memoria en la producción de un agente terapéutico o preventivo contra las enfermedades inflamatorias inmunitarias. Además, también se describe en la presente memoria un polipéptido tal y como está descrito en la presente memoria para ser usado para el tratamiento o la prevención de las enfermedades inflamatorias inmunitarias descritas en la presente memoria.

También se describe en la presente memoria un inhibidor de activación para linfocitos B, mastocitos, células dendríticas y/o basófilos, que comprende un polipéptido descrito en la presente memoria. Además, también se describe en la presente memoria un método para inhibir la activación de linfocitos B, mastocitos, células dendríticas y/o basófilos, que comprende la administración de un polipéptido descrito en la presente memoria a un sujeto. También se describe en la presente memoria un kit para ser usado en el método de inhibición de la activación de linfocitos B, mastocitos, células dendríticas y/o basófilos, que comprende un polipéptido descrito en la presente memoria. También se describe en la presente memoria el uso de un polipéptido descrito en la presente memoria para la producción de inhibidores de activación para linfocitos B, mastocitos, células dendríticas y/o basófilos. También se describe en la presente memoria un polipéptido descrito en la presente memoria para ser usado en el método descrito en la presente memoria para inhibir la activación de linfocitos B, mastocitos, células dendríticas y/o basófilos.

Por otra parte, también se describe en la presente memoria un agente terapéutico contra las enfermedades en las que es defectuosa una proteína necesaria para un organismo, en donde el agente comprende un polipéptido descrito en la presente memoria. También se describe en la presente memoria un método para el tratamiento de enfermedades en las que es defectuosa una proteína necesaria para un organismo, que comprende la administración de un polipéptido descrito en la presente memoria a un sujeto. Por otra parte, también se describe en la presente memoria un kit para ser usado en el método descrito en la presente memoria para tratar enfermedades en las que es defectuosa una proteína necesaria para un organismo, en donde el kit comprende un polipéptido descrito en la presente memoria. También se describe en la presente memoria el uso de un polipéptido descrito en la presente memoria para producir un agente terapéutico contra las enfermedades en las que es defectuosa una proteína necesaria para un organismo. También se describe en la presente memoria un polipéptido descrito en la presente memoria para ser usado en el método descrito en la presente memoria para el tratamiento de enfermedades en las que es defectuosa una proteína necesaria para un organismo.

Además, también se describe en la presente memoria un agente para suprimir la proliferación de virus, que comprende un polipéptido descrito en la presente memoria. También se describe en la presente memoria un método para suprimir la proliferación de virus, que comprende la administración de un polipéptido descrito en la presente memoria a un sujeto. Además, también se describe en la presente memoria un kit descrito en la presente memoria para ser usado en el método con el que suprimir la proliferación de virus, en donde el kit comprende un polipéptido descrito en la presente memoria. También se describe en la presente memoria el uso de un polipéptido descrito en la presente memoria para producir un agente con el que suprimir la proliferación de virus. También se describe en la presente memoria un polipéptido descrito en la presente memoria para ser usado en el método descrito en la presente memoria con el que suprimir la proliferación de virus.

[Efectos de la invención]

Se dan a conocer mediante la presente invención variantes de la región Fc con realce de la actividad de fijación al FcγRIIb y/o realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R), en comparación con cuando la región Fc está intacta. Al utilizar los polipéptidos que contienen las variantes de la región Fc, es posible mejorar las señales inhibidoras de las respuestas inmunitarias inflamatorias mediadas por la fosforilación del ITIM de FcγRIIb. De igual forma, al conferir a una región Fc la propiedad de fijación selectiva al FcγRIIb, se puede suprimir la producción de anticuerpos contra los fármacos. De igual forma, al utilizar una variante de la región Fc de la presente invención como un polipéptido que tiene actividad de fijación al FcRn en una condición en el margen de pH ácido y que comprende un dominio de fijación de antígeno en el cual cambia una actividad de fijación al antígeno de una

molécula de fijación al antígeno según las condiciones de fuerza iónica, se puede promover la eliminación de antígenos que se fijan al polipéptido, que están presentes en el plasma.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un gráfico en el que se muestran los resultados de evaluar la agregación plaquetaria debida al complejo inmunitario omalizumab-G1d-3/IgE en un ensayo de agregación plaquetaria con plaquetas procedentes de un donante que tiene polimorfismo de FcγRIIa (R/H).

La figura 2 es un gráfico en el que se muestran los resultados de evaluar la agregación plaquetaria debida al complejo inmunitario omalizumab-G1d-3/IgE en un ensayo de agregación plaquetaria con plaquetas procedentes de un donante que tiene polimorfismo de FcγRIIa (H/H).

La figura 3 es un gráfico en el que se muestran los resultados de evaluar la expresión de CD62p en una superficie de membranas de plaquetas lavadas. La curva rellena de negro indica el resultado obtenido cuando la reacción con PBS va seguida de la estimulación mediante la adición de ADP, y la curva sin relleno indica el resultado obtenido cuando la reacción con un complejo inmunitario va seguida de la estimulación con ADP.

La figura 4 es un gráfico en el que se muestran los resultados de evaluar la expresión de la integrina activa sobre una superficie de membranas de plaquetas lavadas. La curva rellena de negro indica el resultado obtenido cuando la reacción con PBS va seguida de la estimulación mediante la adición de ADP, y la curva sin relleno indica el resultado obtenido cuando la reacción con un complejo inmunitario va seguida de la estimulación con ADP.

En la figura 5 se muestra el complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb que se determina mediante el análisis de la estructura del cristal por rayos X. Para cada uno de dominio CH2 y dominio CH3 de la región Fc, la porción que se muestra a la izquierda se definió como el dominio A y la porción que se muestra a la derecha se definió como el dominio B.

En la figura 6 se muestra una comparación hecha mediante la superposición de la estructura del cristal por rayos X del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb y la estructura del complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIa (código PDB: 3RY6), con respecto al dominio A del CH2 de Fc mediante el ajuste por mínimos cuadrados basado en distancias de parejas de átomos Cα. En la figura, la estructura del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb se representa con líneas gruesas y la estructura del complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIa se representa con líneas delgadas. Con respecto a la estructura del complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIa, solo se representa el dominio A del CH2 de la porción Fc.

En la figura 7 se muestra la estructura detallada alrededor del Asp de la posición 237 (numeración EU) en el dominio A del CH2 de la porción Fc cuya cadena principal forma un puente de hidrógeno con la Tyr de la posición 160 de FcγRIIb en la estructura del cristal por rayos X del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb.

En la figura 8 se muestra la estructura de los restos de aminoácidos que rodean la cadena lateral del Asp de la posición 237 (numeración EU) en el dominio A del CH2 de la porción Fc cuya cadena principal forma un puente de hidrógeno con la Tyr de la posición 160 de FcγRIIb en la estructura del cristal por rayos X del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb.

En la figura 9 se muestra una imagen de la superposición de la estructura del cristal por rayos X del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb mostrado en el ejemplo 7 de referencia y la estructura del cristal por rayos X del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb, con respecto al dominio B del CH2 de la porción Fc mediante el ajuste por mínimos cuadrados basado en las distancias de las parejas de átomos Cα, para comparar la región en torno al lazo de las posiciones 266 a 271 de acuerdo con la numeración EU. En el lazo, Fc(P208) tiene una alteración H268D en la posición 268 (numeración EU) y una alteración P271G en la posición 271 (numeración EU) cuando se compara con Fc(P238D).

En la figura 10 se muestra la estructura que rodea a la Ser239 del dominio B del CH2 de la porción Fc junto con la densidad electrónica obtenida por el análisis de la estructura del cristal por rayos X que utiliza 2Fo-Fc como el coeficiente en la estructura del cristal por rayos X del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb.

En la figura 11 se muestra una comparación hecha mediante la superposición de la estructura tridimensional del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIa de tipo R y la estructura tridimensional del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb, que se determinan mediante el análisis de la estructura del cristal por rayos X, mediante el ajuste por mínimos cuadrados basado en las distancias de las parejas de átomos Cα.

En la figura 12 se muestra una comparación de la estructura del cristal por rayos X del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIa de tipo R y la estructura del cristal por rayos X del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb en torno al el Asp de la posición 237 (numeración EU) en el dominio A del CH2 de la porción Fc, junto con la densidad electrónica obtenida mediante el análisis de la estructura del cristal por rayos X que utiliza 2Fo-Fc como coeficiente.

En la figura 13 se muestra una comparación de la estructura del cristal por rayos X del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIa de tipo R y la estructura del cristal por rayos X del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb en torno al el Asp de la posición 237 (numeración EU) en el dominio B del CH2 de la porción Fc, junto con la densidad electrónica obtenida mediante el análisis de la estructura del cristal por rayos X que utiliza 2Fo-Fc como coeficiente.

En la figura 14 se muestra una comparación de las secuencias de la región constante de G1d y G4d. En la figura, los aminoácidos recuadrados muestran porciones en donde los restos aminoacídicos son diferentes entre G1d y G4d.

En la figura 15 se muestran los valores de la magnitud de la fijación de cada variante al FcγRIIb en el eje horizontal y la magnitud de la fijación de cada variante al FcγRIIaR en el eje vertical. Las alteraciones que se indican en la figura, G237W, G237F, G236N, P238G, P238N, P238E P238D, se refieren a las alteraciones introducidas en GpH7-B3. A5/B3 se refiere a GpH7-A5/GpH7-B3/GpL16-k0 sin que se haya introducido ninguna alteración en ninguna de las cadenas, y una variante que contiene P238D en solo una de las cadenas se refiere a GpH7-A5/GpH7-BF648/GpL16-k0.

En la figura 16 se muestran los valores KD de cada variante para el FcγRIIb en el eje horizontal y los valores KD de cada variante para el FcγRIIaR en el eje vertical. El IL6R-B3/IL6R-L y el IL6R-G1d/IL6R-L en la figura se refieren a los anticuerpos que tienen secuencias nativas de la IgG de humano que sirven como control de comparación cuando se evalúa cada una de las variantes. El IL6R-BP264/IL6R-L es una variante original cuando se producen cada una de las variantes. El IL6R-BP404/IL6R-L es una variante por introducción de L234Y en ambas cadenas de IL6R-BP264/IL6R-L, que tienen realzada la fijación al FcγRIIb en comparación con la de IL6R-BP264/IL6R-L antes de introducirle la alteración.

En la figura 17 se muestra una comparación de la fijación al FcγRIa y de la fijación al FcγRIIb. Están etiquetadas la fijación del anticuerpo con la sustitución de la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp y la fijación del anticuerpo con la sustitución de la Leu de la posición 328 (numeración EU) por Glu. «Mutación A» se refiere a una alteración producida al sustituir la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp y «mutación B» se refiere a una alteración producida al sustituir la Leu de la posición 328 (numeración EU) por Glu.

En la figura 18 se muestra la comparación de la fijación al FcγRIIa de tipo H y de la fijación al FcγRIIb. Están etiquetadas la fijación del anticuerpo con la sustitución de la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp y la fijación del anticuerpo con la sustitución de la Leu de la posición 328 (numeración EU) por Glu. «Mutación A» se refiere a una alteración producida al sustituir la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp y «mutación B» se refiere a una alteración producida al sustituir la Leu de la posición 328 (numeración EU) por Glu.

En la figura 19 se muestra una comparación de la fijación al FcγRIIa de tipo R y de la fijación al FcγRIIb. Están etiquetadas la fijación del anticuerpo con la sustitución de la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp y la fijación del anticuerpo con la sustitución de la Leu de la posición 328 (numeración EU) por Glu. «Mutación A» se refiere a una alteración producida al sustituir la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp y «mutación B» se refiere a una alteración producida al sustituir la Leu de la posición 328 (numeración EU) por Glu.

En la figura 20 se muestra una comparación de la fijación al FcγRIIIa y de la fijación al FcγRIIb. Están etiquetadas la fijación del anticuerpo con la sustitución de la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp y la fijación del anticuerpo con la sustitución de la Leu de la posición 328 (numeración EU) por Glu. «Mutación A» se refiere a una alteración producida al sustituir la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp y «mutación B» se refiere a una alteración producida al sustituir la Leu de la posición 328 (numeración EU) por Glu.

En la figura 21 se muestra la relación entre los restos aminoacídicos que constituyen la región constante de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y la numeración EU (en la presente memoria, también denominada índice EU).

En la figura 22 se muestra un gráfico en el que el eje horizontal muestra el valor relativo de la actividad de fijación al FcγRIIb que presenta cada variante PD y el eje vertical muestra el valor relativo de la actividad de fijación al FcγRIIa de tipo R que presenta cada variante PD. El valor para la magnitud de la fijación de cada variante PD a cada FcγR se dividió por el valor para la magnitud de la fijación de IL6R-F652/IL6R-L, que es un anticuerpo de control antes de la introducción de la alteración (Fc alterada con la sustitución de la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp), a cada FcγR; y, a continuación, el valor obtenido se multiplicó por 100 y se utilizó como el valor de actividad de fijación relativa para cada variante PD a cada FcγR. El gráfico de F652 en la figura muestra el valor para IL6R-F652/IL6R-L.

En la figura 23 se muestra un gráfico en el cual el eje vertical muestra el valor relativo de la actividad de fijación al FcγRIIb que presentan las variantes producidas mediante la introducción de cada alteración en GpH7-B3 que no tiene la alteración P238D, y el eje horizontal muestra el valor relativo de la actividad de fijación al FcγRIIb que presentan las variantes producidas mediante la introducción de cada alteración en el IL6R-F652 que tiene la alteración P238D. El valor para la magnitud de la fijación al FcγRIIb de cada variante se dividió por el valor de la magnitud de la fijación al FcγRIIb del anticuerpo antes de la alteración; y, a continuación, el valor obtenido se multiplicó por 100 y se utilizó como el valor de la actividad de fijación relativa. Aquí, la región A contiene alteraciones que muestran el efecto del realce de la fijación al FcγRIIb en ambos casos cuando se introduce una alteración en GpH7-B3 que no tiene P238D y cuando se introduce una alteración en el IL6R-F652 que tiene P238D. La región B contiene alteraciones que muestran el

efecto de realce de la fijación al FcγRIIb cuando se introducen en GpH7-B3 que no tiene P238D, pero que no muestran el efecto de realce de la fijación al FcγRIIb cuando se introducen en el IL6R-F652 que tiene P238D.

En la figura 24 se muestra una estructura del cristal del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb.

En la figura 25 se muestra una imagen de la superposición de la estructura del cristal del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb y la estructura modelo del complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIb, con respecto a la región extracelular de FcγRIIb y el dominio A del CH2 de Fc mediante el ajuste por mínimos cuadrados basado en las distancias de las parejas de átomos Cα.

En la figura 26 se muestra la comparación de la estructura detallada en torno a P238D después de la superposición de la estructura del cristal del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb y la estructura modelo del complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIb, con respecto al dominio A del CH2 de Fc o solo el dominio B del CH2 de Fc mediante el ajuste por mínimos cuadrados basado en las distancias de las parejas de átomos Cα.

En la figura 27 se muestra un puente de hidrógeno que se halla en la cadena principal de Gly la de la posición 237 (numeración EU) en el dominio A del CH2 de Fc y la Tyr de la posición 160 en FcγRIIb de la estructura del cristal del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb.

En la figura 28 se muestra una interacción electrostática que se halla entre la el Asp de la posición 270 (numeración EU) en el dominio B del CH2 de Fc y la Arg de la posición 131 en el FcγRIIb de la estructura del cristal del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb.

En la figura 29 se muestra un gráfico en el que el eje horizontal muestra el valor relativo de la actividad de fijación al FcγRIIb que presenta cada variante 2B y el eje vertical muestra el valor relativo de la actividad de fijación al FcγRIIa de tipo R que presenta cada variante 2B. El valor para la magnitud de la fijación de cada variante 2B por cada FcγR se dividió por el valor para la magnitud de la fijación de un anticuerpo de control antes de la alteración (Fc alterada con la sustitución de la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp), a cada FcγR; y, a continuación, el valor obtenido se multiplicó por 100 y se utilizó como el valor de la actividad de fijación relativa de cada variante 2B por cada FcγR.

En la figura 30 se muestra el Glu de la posición 233 (numeración EU) en la cadena A de Fc y los restos que lo rodean en la región extracelular de FcγRIIb en la estructura del cristal del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb.

En la figura 31 se muestra la Ala de la posición 330 (numeración EU) en la cadena A de Fc y los restos que la rodean en la región extracelular de FcγRIIb en la estructura del cristal del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb.

En la figura 32 se muestran las estructuras de la Pro de la posición 271 (numeración EU) de la cadena B de Fc después de la superposición de la estructura del cristal del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb y del complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIa mediante el ajuste por mínimos cuadrados basado en las distancias de las parejas de átomos Cα con respecto a la cadena B de Fc.

En la figura 33 se muestra el cambio de la concentración plasmática de las moléculas de fijación al antígeno administradas a ratones transgénicos con FcγRIIb de humano cuando a los ratones se les administró Fv4-IgG1 o Fv4-P587.

En la figura 34 se muestra el cambio de la concentración plasmática del IL-6R de humano administrado a ratones transgénicos con el FcγRIIb de humano cuando a los ratones se les administró Fv4-IgG1 o Fv4-P587.

En la figura 35 se muestra un mecanismo de acción no limitante para la eliminación de antígenos solubles desde el plasma mediante la administración de anticuerpos que se fijan a antígenos de una manera dependiente de la fuerza iónica, que son anticuerpos con realce de la fijación al FcγR a pH neutro en comparación con la de los anticuerpos neutralizantes existentes.

En la figura 36 se muestra el cambio de la concentración plasmática de las moléculas de fijación al antígeno administradas a ratones transgénicos con FcγRIIb de humano y FcRn de humano cuando a los ratones se les administró Fv4-IgG1, Fv4-P587 o Fv4-P587_LS.

En la figura 37 se muestra el cambio de la concentración plasmática del IL-6R de humano administrado a ratones transgénicos con FcγRIIb de humano y FcRn de humano cuando a los ratones se les administró Fv4-IgG1, Fv4-P587 o Fv4-P587_LS.

Modo de llevar a cabo la invención y la descripción

También se describe en la presente memoria una variante de la región Fc con realce de la actividad de fijación al FcγRIIb y/o con realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R), cuando se compara con una región Fc en la cual no se ha introducido ninguna alteración de sus aminoácidos; y un polipéptido que comprende la variante de la región Fc.

Más específicamente, también se describe en la presente memoria una variante de la región Fc que contiene una secuencia de aminoácidos que tiene una combinación de una alteración de aminoácido en la posición 238 (numeración EU) y otra alteración o alteraciones de aminoácidos concretos; y un polipéptido que comprende la variante de la región Fc. Además, también se describe en la presente memoria un método para realzar la actividad de fijación al FcγRIIb y/o realzar la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R), cuando se compara con la de una región Fc en la cual no se ha introducido ni una ni varias alteraciones de aminoácido, al introducir una o varias alteraciones aminoacídicas en la región Fc. También se describe en la presente memoria un método para suprimir la producción de anticuerpos contra una región Fc mediante la introducción de una o varias alteraciones aminoacídicas en la región Fc cuando la variante de la región Fc se administra a un organismo, en comparación con cuando se administra la región Fc que no lleva introducida ninguna alteración aminoacídica.

Los «polipéptidos» descritos en la presente memoria se refieren por lo general a péptidos o proteínas con una longitud de aproximadamente diez aminoácidos o más. Además, por lo general son polipéptidos procedentes de organismos, pero no están particularmente limitados y, por ejemplo, pueden ser polipéptidos que comprenden una secuencia de diseño artificial. Además, pueden ser cualquiera de los polipéptidos que se producen de forma natural, polipéptidos de síntesis, polipéptidos recombinantes, o similares.

Los ejemplos preferidos de los polipéptidos descritos en la presente memoria incluyen los anticuerpos. Los ejemplos más preferidos incluyen las IgG que se producen de forma natural, en particular las IgG de humano que se producen de forma natural. «IgG que se producen de forma natural (nativas)» se refiere a los polipéptidos que pertenecen a una clase de anticuerpos codificados en la práctica por los genes de la inmunoglobulina γ que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica a las de las IgG halladas en la naturaleza. Por ejemplo, una IgG de humano que se produce de forma natural hace referencia a una IgG1 de humano que se produce de forma natural, una IgG2 de humano que se produce de forma natural, una IgG3 de humano que se produce de forma natural, una IgG4 de humano que se produce de forma natural, o similares. Las IgG que se producen de forma natural también incluyen mutantes de ellas que se producen de forma espontánea.

Con tal de que una región constante de tipo IgK (Kappa, cadena κ), IgL1, IgL2, IgL3, IgL6 e IgL7 (Lambda, cadena λ) esté presente en la región constante de la cadena ligera del anticuerpo, puede ser cualquier región constante de cadena ligera. Se describen numerosas secuencias de alotipo debido a polimorfismos genéticos para la región constante de la IgK de humano (Kappa) y para la región constante de la IgL7 de humano (Lambda) en «Sequences of proteins of immunological interest», publicación del NIH n.º 91-3242, y cualquiera de ellas se pueden utilizar en la presente descripción. Además, en la presente descripción, una región constante de cadena ligera puede ser una región constante de cadena ligera que se ha alterado con sustituciones, adiciones, deleciones, inserciones y/o modificaciones, o similares, de aminoácidos. Para la región Fc de anticuerpo, por ejemplo, existen las regiones Fc de los tipos IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 e IgM. Por ejemplo, se puede utilizar una región Fc del anticuerpo IgG de humano como la región Fc de anticuerpo descrita en la presente memoria, y se prefieren las regiones Fc del anticuerpo de tipo IgG1 de humano. Las regiones Fc que se pueden utilizar como región Fc descrita en la presente memoria son, por ejemplo, las procedentes de regiones constantes de IgG que se produce de forma natural o, de manera específica, una región constante procedente de la IgG1 de humano que se produce de forma natural (SEQ ID n.º 11), una región constante procedente de la IgG2 de humano que se produce de forma natural (SEQ ID n.º 12), una región constante procedente de la IgG3 de humano que se produce de forma natural (SEQ ID n.º 13) y una región constante procedente de la IgG4 de humano que se produce de forma natural (SEQ ID n.º 14). En la figura 21 se muestra la secuencia de las regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 que se producen de forma natural. La región constante de las IgG que se producen de forma natural también incluye mutantes de ellas que se producen de forma espontánea. Para las regiones constantes de los anticuerpos de tipo IgG1 de humano, IgG2 de humano, IgG3 de humano e IgG4 de humano, se describen numerosas secuencias de alotipo debido a polimorfismos genéticos en «Sequences of proteins of immunological interest», publicación del NIH n.º 91-3242, y cualquiera de ellas se pueden utilizar en la presente memoria. En particular, para la secuencia de la IgG1 de humano, la secuencia de aminoácidos entre las posiciones 356 y 358 (numeración EU) puede ser cualquiera de DEL o EEM.

Los «receptores de Fcγ» (en la presente memoria se denominan receptores de Fcγ, FcγR o FcgR) se refieren a los receptores que pueden fijarse a la región Fc de los anticuerpos monoclonales de tipo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y prácticamente significa cualquier miembro de la familia de proteínas codificadas por los genes de los receptores de Fcγ. En los humanos, esta familia incluye FcγRI (CD64) que incluye las isoformas FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc; FcγRII (CD32) que incluye las isoformas FcγRIIa (que incluye los alotipos H131 (tipo H) y R131 (tipo R)), FcγRIIb (que incluye los FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2) y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16) que incluye las isoformas FcγRIIIa (que incluye los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (que incluye los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2), y cualquiera los FcγR de humano, o isoforma o alotipo de FcγR aún por descubrir, pero no se limita a ellos. Se ha descrito que FcγRIIb1 y FcγRIIb2 son variantes de ayuste del FcγRIIb de humano. Además, se ha descrito una variante de ayuste denominada FcγRIIb3 (*J. Exp. Med*, 1989, 170: 1369). Además de estas variantes de ayuste, el FcγRIIb de humano incluye todas las variantes de ayuste registradas en el NCBI, que son NP_001002273.1, NP_001002274.1, NP_001002275.1, NP_001177757.1 y NP_003992.3. Además, el FcγRIIb de humano incluye cada polimorfismo genético descrito anteriormente, así como FcγRIIb (*Arthritis Rheum*, 2003, 48: 3242-52; *Hum Mol Genet*, 2005, 14: 2881-92; y *Arthritis Rheum*. mayo de 2002; 46 (5): 1242-54) y cada polimorfismo genético que se describa en el futuro.

El FcγR incluye los FcγR procedentes de humano, ratón, rata, conejo y mono, pero no se limita a ellos, y puede proceder de cualquier organismo. Los FcγR de ratón incluyen FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) y FcγRIII-2 (CD16-2) y cualquier FcγR de ratón, o isoforma o alotipo de FcγR de ratón aún por descubrir, pero no se limitan a ellos. Los ejemplos favorables de tales receptores de Fcγ de humano incluyen FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIB (CD32), FcγRIIIA (CD16) y/o FcγRIIIB (CD16) de humano.

La secuencia polinucleotídica y la secuencia de aminoácidos del FcγRI se presentan en las SEQ ID n.os 1 (NM_000566.3) y 2 (NP_000557.1), respectivamente;

la secuencia polinucleotídica y la secuencia de aminoácidos de FcγRIIA se presentan en las SEQ ID n.os 3 (BC020823.1) y 4 (AAH20823.1), respectivamente;

la secuencia polinucleotídica y la secuencia de aminoácidos de FcγRIIB se presentan en las SEQ ID n.os 5 (BC146678.1) y 6 (AAI46679.1), respectivamente;

la secuencia polinucleotídica y la secuencia de aminoácidos de FcγRIIIA se presentan en las SEQ ID n.os 7 (BC033678.1) y 8 (AAH33678.1), respectivamente; y

la secuencia polinucleotídica y la secuencia de aminoácidos de FcγRIIIB se presentan en las SEQ ID n.os 9 (BC128562.1) y 10 (AAI28563.1), respectivamente (el número de registro de RefSeq se indica entre paréntesis).

En el FcγRIIa hay dos alotipos, uno en donde el aminoácido de la posición 131 de FcγRIIa es la histidina (tipo H), y el otro donde este aminoácido está sustituido por arginina (tipo R) (*J. Exp. Med*, 172: 19-25, 1990).

En la presente memoria, una «región Fc en la que no se ha introducido ninguna alteración aminoacídica», o una expresión similar, se refiere a una región Fc antes de que se le hayan introducido las alteraciones aminoacídicas descritas en la presente memoria. En la presente descripción, esta puede ser, por ejemplo, una región Fc de IgG nativa o una región Fc de IgG producida por la adición de una alteración diferente de las alteraciones aminoacídicas descritas en la presente memoria para una IgG nativa. Además, en la presente descripción, «variante de la región Fc» se refiere a una región Fc en la que se ha cambiado al menos un aminoácido por otro aminoácido descrito en la presente memoria en la región Fc sin introducir las alteraciones aminoacídicas descritas en la presente memoria. En la presente memoria, la región Fc con «la alteración de al menos un aminoácido por otro aminoácido» incluye una región Fc en la que se ha introducido esta alteración de aminoácido y una región Fc que consiste en la misma secuencia de aminoácidos.

«IgG que se produce de forma natural» se refiere a los polipéptidos que pertenecen a una clase de anticuerpos codificados en la práctica por los genes de la inmunoglobulina γ que comprenden una secuencia de aminoácidos idéntica a la de las IgG halladas en la naturaleza. Por ejemplo, una IgG de humano que se produce de forma natural se refiere a una IgG1 de humano nativa, una IgG2 de humano nativa, una IgG3 de humano nativa, una IgG4 de humano nativa que se produce de forma natural, o similares. Las IgG que se producen de forma natural también incluyen mutantes de ellas que se producen de forma espontánea.

La región Fc de una IgG nativa se refiere a una región Fc que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la región Fc procedente de una IgG hallada en la naturaleza. La región constante de la cadena pesada de una IgG nativa se muestra en la figura 21 (SEQ ID n.os 11-14) y, por ejemplo, se refiere, en la figura 21, a las regiones Fc en la región constante de la cadena pesada procedente de la IgG1 de humano nativa, regiones Fc en la región constante de la cadena pesada procedente de la IgG2 de humano nativa, regiones Fc en la región constante de la cadena pesada procedente de la IgG3 de humano nativa, y regiones Fc en la región constante de la cadena pesada procedente de la IgG4 de humano nativa. La región Fc de las IgG nativas también incluyen mutantes de ellas que se producen de forma espontánea.

En la presente descripción, tanto si realza como si no la actividad de fijación por cada tipo de FcγR, o se mantiene o se disminuye en un polipéptido que comprende una variante de la región Fc o una variante de la región Fc descrita en la presente memoria, se puede determinar, por ejemplo, mediante la observación de si hay una disminución o un incremento del valor de la constante de disociación (KD) obtenido de los resultados del análisis del sensograma, en donde diferentes FcγR están sometidos a la interacción como analito con los anticuerpos inmovilizados sobre los chips sensores o capturados sobre los chips sensores mediante el uso de proteína A, proteína L, proteína A/G, proteína G, anticuerpos contra la cadena λ, anticuerpos contra la cadena κ, péptidos antigénicos, proteínas antigénicas o similares, mediante el uso de BIACORE, que es un analizador de interacciones que utiliza los fenómenos de resonancia de plasmón superficial (RPS), tal y como se muestra en los ejemplos. Como alternativa, también se puede determinar mediante la observación si hay un incremento o una disminución del valor obtenido al dividir la magnitud de cambio del valor en unidades de resonancia (UR) del sensograma antes y después de someter los diferentes tipos de FcγR a una interacción como analito con anticuerpos inmovilizados sobre los chips sensores o capturados sobre los chips sensores con proteína A, proteína L, proteína A/G, proteína G, anticuerpos contra la cadena λ, anticuerpos contra la cadena κ, péptidos antigénicos, proteínas antigénicas, o similares, mediante la magnitud de cambio de las unidades de resonancia (UR) antes y después de que los anticuerpos se inmovilicen o capturen sobre el chip sensor. Además, se puede determinar al observar un incremento o una disminución de los valores de la constante de disociación (KD) obtenidos del análisis del sensograma, en donde una muestra, tal como un anticuerpo a evaluar, se somete a la

interacción como analito mediante el uso de un chip sensor sobre el cual se inmoviliza el FcγR directamente o a través de un anticuerpo contra una etiqueta. Como alternativa, se puede determinar por observación si la magnitud del cambio en los valores del sensograma se incrementa o se disminuye antes y después de que una muestra, tal como un anticuerpo a evaluar, se someta a la interacción como analito con el chip sensor sobre el cual se inmoviliza el FcγR directamente o a través de un anticuerpo contra una etiqueta.

Específicamente, la actividad de fijación de una variante de la región Fc por un receptor de Fcγ se puede medir mediante el escrutinio por análisis homogéneo luminiscente y amplificado de proximidad (ALPHA, por su nombre en inglés), el método BIACORE que utiliza los fenómenos de resonancia de plasmón superficial (RPS), o similares, además de ELISA o la clasificación de células activadas fluorescentes (FACS) (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2006) 103 (11): 4005-4010).

El escrutinio ALPHA se realiza con la tecnología ALPHA que utiliza dos perlas, un donante y un aceptor, basándose en los principios que vienen a continuación. Las señales luminiscentes se detectan solo cuando las moléculas fijadas a las perlas donantes interaccionan físicamente con las moléculas fijadas a las perlas aceptoras, y las dos perlas se encuentran muy cerca la una de la otra. El fotosensibilizador excitado con láser en las perlas donantes convierte el oxígeno del entorno en oxígeno singulete en estado excitado. El oxígeno singulete se dispersa en torno a las perlas donantes y, cuando alcanza las perlas aceptoras adyacentes, se induce la reacción quimioluminiscente en las perlas y finalmente se emite luz. Cuando las moléculas fijadas a las perlas donantes no interaccionan con las moléculas fijadas a las perlas aceptoras, no se lleva a cabo la reacción de quimioluminiscencia porque el oxígeno singulete producido por las perlas donantes no llega a las perlas aceptoras.

Por ejemplo, un complejo de polipéptidos biotinilados está fijado a las perlas donantes y el receptor de Fcγ etiquetado con la glutatión S transferasa (GST) está unido a las perlas aceptoras. En ausencia de un complejo de polipéptidos competidor que comprenda una variante de la región Fc, el complejo de polipéptidos que comprende una región Fc de tipo silvestre interacciona con el receptor de Fcγ y produce señales de 520-620 nm. El complejo de polipéptidos que comprende una región Fc mutante sin etiquetar compite con el complejo de polipéptidos que comprende una región Fc de tipo silvestre por la interacción con el receptor de Fcγ. La actividad de fijación relativa se puede determinar mediante la cuantificación de la disminución en la fluorescencia observada como resultado de la competición. Se conoce bien la biotinilación de los complejos de polipéptidos, tales como los anticuerpos, con el uso de sulfo-NHS-biotina y similares. El método de expresión del receptor de Fcγ y GST en una célula que lleva un gen de fusión producido mediante la fusión de un polinucleótido que codifica el receptor de Fcγ en fase con un polinucleótido que codifica la GST en un vector de expresión, y la purificación en una columna con glutatión, se adopta de manera adecuada como método para etiquetar un receptor de Fcγ con la GST. Las señales obtenidas se analizan preferiblemente, por ejemplo, ajustándolas a un modelo de competición de un sitio que utiliza un análisis de regresión no lineal utilizando un programa informático tal como GRAPHPAD PRISM (GraphPad, San Diego).

Una de las sustancias (el ligando) en la observación de una interacción se inmoviliza sobre una película delgada de oro sobre un chip sensor y, al alumbrarla desde el lado opuesto del chip sensor de tal modo que tenga lugar la reflexión total en la interfase entre la película delgada de oro y el vidrio, una porción con menos intensidad de reflexión se forma en parte de la luz reflejada (señal de RPS). Cuando la otra sustancia (el analito) en observación de una interacción se hace que fluya sobre la superficie del chip sensor y el ligando se fija al analito, se incrementa la masa de la molécula de ligando inmovilizada y cambia el índice de refracción del solvente sobre la superficie del chip sensor. La posición de la señal de RPS se desplaza como resultado de este cambio en el índice de refracción (por otra parte, la posición de la señal se restablece cuando se disocia esta fijación). El sistema Biacore indica la magnitud del desplazamiento mencionado más arriba o, más específicamente, la variable del tiempo de la masa al representar el cambio de la masa sobre la superficie del chip sensor sobre la ordenada como los datos de medición (sensograma). La cantidad de analito fijado al ligado atrapado sobre la superficie del chip sensor se determina a partir del sensograma. Los parámetros cinéticos, tales como las constantes de la velocidad de asociación (ka) y de la velocidad de disociación (kd) se determinan a partir de las curvas del sensograma, y las constantes de disociación (KD) se determinan a partir de la relación de estas constantes. En el método BIACORE, se utiliza preferiblemente un método para medir la inhibición. Un ejemplo del método para medir la inhibición se describe en *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (2006) 103 (11): 4005-4010.

Una región de Fc con disminución de la actividad de fijación al FcγR o un polipéptido que comprende esta región Fc se refiere a una variante de la región Fc o un polipéptido que comprende la variante de la región Fc que se fija al FcγR con la actividad de fijación esencialmente más débil que un polipéptido que comprende la región Fc original cuando los ensayos se realizan con el uso de sustancialmente la misma cantidad de un polipéptido que comprende una región Fc en la cual no se ha introducido ninguna alteración aminoacídica (también denominados polipéptidos que comprenden las regiones Fc originales o polipéptidos originales) y un polipéptido que comprende al menos una alteración de aminoácido en la región Fc (también denominado polipéptido que comprende una variante de la región Fc o polipéptido alterado).

Además, una región Fc con realce de la actividad de fijación al FcγR o un polipéptido que comprende la región Fc se refiere a una variante de la región Fc o a un polipéptido que comprende la variante de la región Fc que se fija al FcγR con una actividad de fijación esencialmente más fuerte que un polipéptido que contiene la región Fc original cuando los ensayos se realizan con el uso de sustancialmente la misma cantidad de un polipéptido que comprende una región Fc original y un polipéptido que comprende una variante de la región Fc.

Un polipéptido con una actividad de fijación al FcγR mantenida se refiere a un polipéptido que se fija al FcγR con una actividad de fijación equivalente o que esencialmente no difiere de la del polipéptido original cuando los ensayos se realizan con el uso de sustancialmente la misma cantidad de un polipéptido que comprende una región Fc original y un polipéptido que comprende la variante de la región Fc.

En la presente descripción, realce de la actividad de fijación al FcγRIIb significa preferiblemente, por ejemplo, que la relación del valor de KD para [valor de KD de un polipéptido que comprende una región Fc original para el FcγRIIb]/[valor de KD de un polipéptido que comprende una variante de la región Fc para el FcγRIIb] en los valores KD medidos mediante el método de medición mencionado más arriba preferiblemente llega a ser de 15.0 o mayor, 20.0 o mayor, 25.0 o mayor, 30.0 o mayor, 35.0 o mayor, 40.0 o mayor, 45.0 o mayor, o incluso 50.0 o mayor, 55.0 o mayor, 60.0 o mayor, 65.0 o mayor, 70.0 o mayor, 75.0 o mayor, 80.0 o mayor, 85.0 o mayor, 90.0 o mayor, 95.0 o mayor, o 100.0 o mayor.

Además, «una variante de la región Fc descrita en la presente memoria muestra realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa» significa que:

(i) la actividad de fijación al FcγRIIb está realzada y la actividad de fijación al FcγRIIa se mantiene o disminuye;

(ii) la actividad de fijación al FcγRIIb está realzada y la actividad de fijación al FcγRIIa está también realzada, pero el grado de realce de la actividad de fijación al FcγRIIa es menor que el grado de realce de la actividad de fijación al FcγRIIb; o

(iii) la actividad de fijación al FcγRIIb está disminuida, pero el grado de disminución de esta actividad de fijación es menor que el grado de disminución de la actividad de fijación al FcγRIIa. Si una variante de la región Fc descrita en la presente memoria es o no una variante con realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en vez de por el FcγRIIa se puede determinar, por ejemplo, al comparar la relación del valor de KD para el FcγRIIa con el valor de KD para el FcγRIIb que presenta el polipéptido que comprende una variante de la región Fc descrita en la presente memoria (valor de KD para el FcγRIIa/valor de KD para el FcγRIIb) con la relación del valor de KD para el FcγRIIa entre el valor de KD para el FcγRIIb que presenta el polipéptido que comprende la región Fc original (valor de KD para el FcγRIIa/valor de KD para el FcγRIIb), que se determinaron de acuerdo con los ejemplos mencionados más arriba. Específicamente, cuando el valor de la relación de KD para el polipéptido que comprende la variante de la región Fc descrita en la presente memoria es mayor que la del polipéptido que comprende la región Fc original, el polipéptido que comprende la variante de la región Fc descrita en la presente memoria se puede determinar que tiene realzada la selectividad de fijación por el FcγRIIb en vez de por el FcγRIIa en comparación con el polipéptido que comprende la variante de la región Fc original. En particular, ya que la actividad de fijación al FcγRIIa (tipo R) es probable que se correlacione con la actividad de fijación al FcγRIIb en vez de con el FcγRIIa (tipo H), es importante hallar qué alteraciones aminoacídicas pueden realzar la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R) para realzar la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con otros FcγR diferentes al FcγRIIb.

La selectividad de fijación entre el FcγRIIa (tipo R) y el FcγRIIb es, por ejemplo, una relación del valor de KD [valor de KD del polipéptido que comprende la variante de la región Fc para el FcγRIIa (tipo R)]/[valor de KD del polipéptido que comprende la variante de la región Fc para el FcγRIIb] de preferiblemente 10.0 o más para los valores de KD medidos mediante el método de medición descrito más arriba, y más preferiblemente 20.0 o más.

La selectividad de fijación entre el FcγRIIa (tipo H) y el FcγRIIb es, por ejemplo, una relación de valores de KD [valor de KD del polipéptido que comprende la variante de la región Fc para el FcγRIIa (tipo H)]/[valor de KD del polipéptido que comprende la variante de la región de Fc para el FcγRIIb] de preferiblemente 100.0 o más, 200 o más, 300 o más, 400 o más o 500 o más, para los valores de KD medidos mediante el método de medición descrito más arriba, y más preferiblemente de 600 o más, 700 o más, 800 o más, o 900 o más.

Además, que la actividad de fijación a los diferentes FcγR que presentan los polipéptidos descritos en la presente memoria estuviera mantenida, realzada o disminuida, o no, se puede determinar a partir del incremento o disminución de la magnitud de la fijación de los diferentes FcγR a los polipéptidos descritos en la presente memoria, que se determinó de acuerdo con los ejemplos descritos más arriba. Aquí, la magnitud de la fijación de los diferentes FcγR a los polipéptidos se refiere a los valores obtenidos al determinar la diferencia en los valores de UR de los sensogramas que cambiaron antes y después de la interacción de los diferentes FcγR como el analito con cada polipéptido, y dividiéndolos por las diferencias en los valores de UR de los sensogramas que cambiaron antes y después de capturar los polipéptidos en los chips sensores.

Las variantes de la región Fc descritas en la presente memoria no se limitan en particular en términos de sus valores de KD (mol/l) para el FcγRIIb y, por ejemplo, los valores pueden ser 9×10^{-7} o menos, preferiblemente 5×10^{-7} o menos, más preferiblemente 3×10^{-7} o menos, incluso más preferiblemente 1×10^{-7} o menos, y aún incluso más preferiblemente 5×10^{-8} o menos.

«Región Fc» se refiere al fragmento que consiste en una porción bisagra de una parte del mismo, dominio CH2 y dominio CH3 en una molécula de anticuerpo. De acuerdo con la numeración EU (en la presente memoria, también se denomina índice EU) (véase la figura 21), una región Fc de la clase IgG se refiere a, por ejemplo, la región desde la

cisteína de la posición 226 hasta el extremo carboxilo, o desde la prolina de la posición 230 hasta el extremo carboxilo, pero no se limita a ellas.

La región Fc se puede obtener preferiblemente volviendo a eluir la fracción adsorbida sobre la columna con la proteína A después de digerir parcialmente los anticuerpos monoclonales de tipo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 o similares con una proteasa, tal como la pepsina. La proteasa no está particularmente limitada, siempre y cuando pueda digerir un anticuerpo completo de tal modo que se produzcan Fab y $F(ab')_2$ de una manera restrictiva al ajustar de manera adecuada las condiciones de reacción de la enzima, tales como el pH, y los ejemplos incluyen pepsina y papaína.

También se describen en la presente memoria variantes de la región Fc que tienen una combinación de alteraciones que incluye la alteración del aminoácido en la posición 238 (numeración EU) en otro aminoácido y la alteración de al menos un aminoácido seleccionado de los aminoácidos en las posiciones 233, 234, 235, 237, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 271, 272, 274, 296, 326, 327, 330, 331, 332, 333, 334, 355, 356, 358, 396, 409 y 419 (numeración EU) en otro aminoácido en la región Fc de una IgG de humano (IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). Al combinar la alteración del aminoácido en la posición 238 (numeración EU) en otro aminoácido con la alteración de al menos un aminoácido seleccionado de los aminoácidos en las posiciones 233, 234, 237, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 271, 272, 274, 296, 326, 327, 330, 331, 332, 333, 334, 355, 356, 358, 396, 409 y 419 (numeración EU) en otro aminoácido en la región Fc de IgG de humano, es posible dar a conocer un polipéptido que comprende una variante de la región Fc con realce de la actividad de fijación al FcγRIIb y/o realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb, en comparación con el FcγRIIa, con el FcγRIIa (tipo R) en particular, en comparación con los de un polipéptido que contiene una región Fc en la cual no se ha introducido ninguna alteración de aminoácido. Otras alteraciones de aminoácidos que se combinarán con la alteración de aminoácido en la posición 238 (numeración EU) son preferiblemente las de las posiciones 233, 237, 264, 267, 268, 271, 272, 296, 327, 330, 332, 333 y 396 (numeración EU) y, en particular, preferiblemente las de las posiciones 233, 237, 264, 267, 268, 271, 296, 330, and 396 (numeración EU). En concreto, en términos de realce de la actividad de fijación al FcγRIIb o de realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa, un ejemplo de una combinación preferida de alteraciones de aminoácido incluye la combinación de alteraciones en las posiciones de los aminoácidos 238, 268 y 271 (numeración EU) con al menos una posición de aminoácido seleccionada de 233, 237, 264, 267, 272, 296, 327, 330, 332 y 396 (numeración EU).

Los aminoácidos a alterar no están particularmente limitados ya que conducen a realzar la actividad de fijación al FcγRIIb o a realzar la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa cuando se comparan antes de la alteración, pero se prefiere que el aminoácido de la posición 238 sea Asp, el aminoácido de la posición 233 sea Asp, el aminoácido de la posición 234 sea Tyr, el aminoácido de la posición 235 sea Phe, el aminoácido de la posición 237 sea Asp, el aminoácido de la posición 264 sea Ile, el aminoácido de la posición 265 sea Glu, el aminoácido de la posición 266 sea Phe, Leu o Met, el aminoácido de la posición 267 sea Ala, Glu, Gly o Gln, el aminoácido de la posición 268 sea Asp, Gln o Glu, el aminoácido de la posición 269 sea Asp, el aminoácido de la posición 271 sea Gly, el aminoácido de la posición 272 sea Asp, Phe, Ile, Met, Asn, Pro o Gln, el aminoácido de la posición 274 sea Gln, el aminoácido de la posición 296 sea Asp o Phe, el aminoácido de la posición 326 sea Ala o Asp, el aminoácido de la posición 327 sea Gly, el aminoácido de la posición 330 sea Lys, Arg o Ser, el aminoácido de la posición 331 sea Ser, el aminoácido de la posición 332 sea Lys, Arg, Ser o Thr, el aminoácido de la posición 333 sea Lys, Arg, Ser o Thr, el aminoácido de la posición 334 sea Arg, Ser o Thr, el aminoácido de la posición 355 sea Ala o Gln, el aminoácido de la posición 356 sea Glu, el aminoácido de la posición 358 sea Met, el aminoácido de la posición 396 sea Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr, el aminoácido de la posición 409 sea Arg, y el aminoácido de la posición 419 sea Glu, de acuerdo con la numeración EU. En particular, cuando se combinan alteraciones en las posiciones de los aminoácidos 238, 268 y 271 (numeración EU) con al menos una posición de aminoácido seleccionada de 233, 264, 267, 272, 296, 327, 330, 332 y 396 (numeración EU), se prefiere que el aminoácido de la posición 238 sea Asp, el aminoácido de la posición 268 sea Asp o Glu, el aminoácido de la posición 271 sea Gly, el aminoácido de la posición 233 sea Asp, el aminoácido de la posición 237 sea Asp, el aminoácido de la posición 264 sea Ile, el aminoácido de la posición 267 sea Ala o Gly, el aminoácido de la posición 272 sea Asp o Pro, el aminoácido de la posición 296 sea Asp, el aminoácido de la posición 327 sea Gly, el aminoácido de la posición 330 sea Arg, el aminoácido de la posición 332 sea Thr, y el aminoácido de la posición 396 sea Leu o Met, de acuerdo con la numeración EU.

Además de estas alteraciones, en la presente descripción se puede añadir al menos una alteración diferente de la región Fc. La alteración añadida no está particularmente limitada, siempre y cuando se realce la actividad de fijación al FcγRIIb y/o la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa. Además, se pueden realizar alteraciones mediante la combinación de una alteración en la que una porción de una región Fc está sustituida por una porción correspondiente de la región Fc de un isotipo diferente. Por ejemplo, es posible realzar la actividad de fijación al FcγRIIb y/o la selectividad de fijación por el FcγRIIb mediante la combinación de las alteraciones de aminoácido mencionadas más arriba con la sustitución de la secuencia de aminoácidos desde la Ala de la posición 118 hasta la Thr de la posición 225 (numeración EU) en la región Fc procedente de IgG1 por la secuencia de aminoácidos desde la Ala de la posición 118 hasta la Pro de la posición 228 (numeración EU) de la región Fc procedente de la IgG4. Un ejemplo específico incluye una combinación de alteraciones de aminoácido introducidas en el IL6R-BP230, y la alteración que es la sustitución de la secuencia de aminoácidos desde la Ala de la posición 118 hasta la Thr de la posición 225 (numeración EU) en G1d por la secuencia de aminoácidos desde la Ala de la posición 118 hasta la Pro de la posición 222 (numeración EU) en G4d, como la descrita para IL6R-BP478/IL6R-L en el ejemplo 7.

Entre ellas, se prefieren las alteraciones que conducen al mayor realce de la actividad de fijación al FcγRIIb o que conducen al mayor realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R). Ejemplos de tales combinaciones preferidas de alteraciones aminoacídicas incluyen las siguientes de (a) a (x):

(a) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 268, 271, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(b) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 268, 271, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(c) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 268, 271, 296, 330 y 332 (numeración EU) de una región Fc;

(d) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268, 271 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(e) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 267, 268, 271, 296, 330 y 332 (numeración EU) de una región Fc;

(f) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 267, 268, 271, 296, 330 y 332 (numeración EU) de una región Fc;

(g) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 268, 271, 296, 327 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(h) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268 y 271 (numeración EU) de una región Fc;

(i) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268, 271, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(j) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268, 271, 296, 330 y 396 (numeración EU) de una región Fc;

(k) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 264, 267, 268, 271 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(l) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 264, 267, 268, 271, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(m) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 264, 267, 268 y 271 (numeración EU) de una región Fc;

(n) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 264, 267, 268, 271 y 296 (numeración EU) de una región Fc;

(o) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 267, 268, 271, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(p) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268, 271, 330 y 396 (numeración EU) de la región Fc;

(q) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268, 271, 296, 327, 330 y 396 (numeración EU) de una región Fc;

(r) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268, 271, 272 y 296 (numeración EU) de una región Fc;

(s) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 264, 267, 268, 271, 272 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(t) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 264, 267, 268, 271, 272, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(u) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 264, 267, 268 y 271 (numeración EU) de una región Fc;

(v) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 267, 268, 271, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(w) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 264, 267, 268, 271, 272 y 296 (numeración EU) de una región Fc; y

(x) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 264, 267, 268, 271 y 296 (numeración EU) de una región Fc;

Además, entre estas combinaciones, las siguientes combinaciones de alteraciones aminoacídicas de (a) a (x) que vienen a continuación son las combinaciones de aminoácidos más preferidas:

(a) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(b) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp o Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(c) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 332 es Thr, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(d) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Gly o Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(e) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 332 es Thr, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(f) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 332 es Thr, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(g) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 327 es Gly, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(h) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, y el aminoácido de la posición 271 es Gly, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(i) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(j) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 396 es Met o Leu, de acuerdo con la numeración EU, en la región Fc;

(k) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(l) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(m) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, y el aminoácido de la posición 271 es Gly, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(n) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, y el aminoácido de la posición 296 es Asp, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(o) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 267 es Ala o Gly, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(p) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 396 es Met o Leu, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(q) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 327 es Gly, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 396 es Met, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(r) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 272 es Asp, y el aminoácido de la posición 296 es Asp, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(s) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 272 es Pro, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(t) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 272 es Pro, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(u) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, y el aminoácido de la posición 271 es Gly, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(v) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 267 es Gly, el aminoácido de la posición 268 es Asp, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(w) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 272 es Asp, y el aminoácido de la posición 296 es Asp, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc; y

(x) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, y el aminoácido de la posición 296 es Asp, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc.

Además, las alteraciones aminoacídicas realizadas con otros propósitos se pueden combinar en polipéptidos que comprenden una variante de la región Fc descrita en la presente memoria. Por ejemplo, se pueden añadir las sustituciones de aminoácido que realzan la actividad de fijación al FcRn (*J. Immunol*. de 1 de enero de 2006; 176 (1): 346-56; *J Biol Chem*. de 18 de agosto de 2006; 281 (33): 23514-24; *Int. Immunol*. de diciembre de 2006; 18 (12): 1759-69; *Nat Biotechnol*. de febrero de 2010; 28 (2): 157-9; solicitud de patente internacional WO 2006/019447; solicitud de patente internacional WO 2006/053301; y solicitud de patente internacional WO/2009/086320), y las sustituciones de aminoácido para mejorar la heterogeneidad o la estabilidad de los anticuerpos (solicitud de patente internacional WO/2009/041613). Como alternativa, también se describen en la presente memoria los polipéptidos producidos al conferir polipéptidos que comprenden una variante de la región Fc descrita en la presente memoria con la propiedad de promover la desaparición de los antígenos, que se describen en la solicitud de patente internacional WO 2011/122011 o PCT/JP2011/072550, y los polipéptidos que confieren la propiedad de repetir la fijación a numerosas moléculas de antígeno, que se describen en las solicitudes de patente internacional WO 2009/125825, WO 2012/073992 o WO 2013/047752. Como alternativa, con el objeto de incrementar la retención plasmática, las alteraciones aminoacídicas que disminuyen el pI de la región constante (solicitud de patente internacional WO/2012/016227) se pueden combinar en un polipéptido que comprende una variante de la región Fc descrita en la presente memoria. Como alternativa, con el objeto de conferir la capacidad de fijación a otros antígenos, las alteraciones aminoacídicas descritas en las patentes europeas EP1752471 y EP1772465 se pueden combinar en el CH3 de un polipéptido que comprende una variante de la región Fc descrita en la presente memoria.

Cuando un polipéptido que comprende una variante de la región Fc descrita en la presente memoria es una molécula de fijación a antígeno, tal como un anticuerpo, las alteraciones aminoacídicas que realzan la actividad de fijación al FcRn de humano en una condición ácida de intervalo de pH se pueden combinar para realzar el efecto de la molécula de fijación a antígeno para eliminar los antígenos del plasma. Más específicamente, las alteraciones utilizadas para realzar la actividad de fijación al FcRn de humano en una condición ácida de intervalo de pH se pueden llevar a cabo en un anticuerpo de tipo IgG, por ejemplo, mediante un método con el que sustituir la Leu por Met en la posición 428 y con el que sustituir la Ser por Asn en la posición 434, de acuerdo con la numeración EU (*Nat Biotechnol*, 2010, 28: 157-159); un método con el que sustituir la Ala por Asn en la posición 434 (*Drug Metab Dispos*. de abril de 2010; 38 (4): 600-5); un método con el que sustituir la Tyr por Met en la posición 252, con el que sustituir la Thr por Ser en la posición 254, y con el que sustituir el Glu por Thr en la posición 256 (*J Biol Chem*, 2006, 281: 23514-23524); un método con el que sustituir la Gln por Thr en la posición 250 y con el que sustituir la Leu por Met en la posición 428 (*J Immunol*. 2006, 176(1): 346-56); un método con el que sustituir la His por Asn en la posición 434 (*Clinical Pharmacology & Therapeutics* (2011) 89(2): 283-290), o con el uso de alteraciones tales como las descritas en las solicitudes de patente internacional WO2010106180, WO2010045193, WO2009058492, WO2008022152, WO2006050166, WO2006053301, WO2006031370, WO2005123780, WO2005047327, WO2005037867, WO2004035752, WO2002060919 o similares.

Además, se ha descrito recientemente que a los factores reumatoides (FR) se fija una molécula de anticuerpo producida por la sustitución de His por Asn en la posición 434 (numeración EU) en el anticuerpo humanizado anti-CD4 para realzar la actividad de fijación al FcRn de humano en una condición ácida de intervalo de pH y para mejorar las propiedades de retención en el plasma (*Clin Pharmacol Ther*. de febrero de 2011; 89 (2): 283-90). Este anticuerpo tiene una región Fc de la IgG1 de humano, pero al sustituir la His por Asn en la posición 434 que está colocada en el sitio de fijación al FcRn, se ha demostrado que se fija a factores reumatoides que reconocen este sitio sustituido.

Tal y como se describe más arriba, se han descrito diferentes alteraciones por ser alteraciones que realzan la actividad de fijación al FcRn de humano en una condición ácida de intervalo de pH; sin embargo, al introducir estas alteraciones en el sitio de fijación al FcRn en una región Fc, se le puede mejorar la afinidad por los factores reumatoides que reconocen este sitio.

Sin embargo, al introducir alteraciones que no reducen la actividad de fijación al FcRn y reducen solo la actividad de fijación a los factores reumatoides en el sitio en la región Fc, se pueden producir moléculas de fijación al antígeno con realce de la actividad de fijación al FcRn de humano en una condición ácida de intervalo de pH y sin afinidad por los factores reumatoides.

Para las alteraciones que reducen la actividad de fijación a los factores reumatoides, se utilizan alteraciones en las posiciones 248-257, 305-314, 342-352, 380-386, 388, 414-421, 423, 425-437, 439 y 441-444 de acuerdo con la numeración EU. Preferiblemente, se utilizan las alteraciones en las posiciones 387, 422, 424, 426, 433, 436, 438 y 440. Con particular preferencia, se utiliza la alteración de sustituir el Glu o la Ser por Val en la posición 422, la alteración de sustituir la Arg por Ser en la posición 424, la alteración de sustituir el Asp por His en la posición 433, la alteración de sustituir la Thr por Tyr en la posición 436, la alteración de sustituir la Arg o la Lys por Gln en la posición 438, y la alteración de sustituir el Glu o el Asp por Ser en la posición 440. Estas alteraciones se pueden utilizar solas o en combinación con alteraciones en muchas posiciones.

Como alternativa, para disminuir la actividad de fijación a los factores reumatoides se puede introducir una secuencia de glucosilación de tipo N en este sitio. Específicamente, Asn-Xxx-Ser/Thr (Xxx es cualquier aminoácido diferente de Pro) se sabe que es una secuencia de glucosilación de tipo N. La adición de una cadena de polisacárido de tipo N mediante la introducción de esta secuencia en el sitio de la región Fc permite la inhibición de la fijación a los FR mediante impedimento estérico debido a la cadena de polisacárido de tipo N. Las alteraciones utilizadas para añadir

una cadena de polisacárido de tipo N son preferiblemente la alteración que sustituye la Asn por Lys en la posición 248, la alteración que sustituye la Asn por Ser en la posición 424, la alteración que sustituye la Asn por Thr en la posición 436 y que sustituye la Thr por Gln en la posición 438, y la alteración que sustituye el Asp por Gln en la posición 438. Con particular preferencia, se utiliza la alteración que sustituye la Asn por Ser en la posición 424.

Un ejemplo preferido de un polipéptido que comprende una variante de la región Fc descrita en la presente memoria incluye un polipéptido que comprende al menos dos variantes de la región Fc, en donde las dos variantes de la región Fc están asociadas, de manera muy parecida a un anticuerpo de tipo IgG. Cuando se utiliza un anticuerpo de tipo IgG como un polipéptido descrito en la presente memoria, no está limitado el tipo de región constante y se pueden utilizar isotipos (subclases) de IgG, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Los anticuerpos de IgG descritos en la presente memoria son preferiblemente IgG de humano y, más preferiblemente, IgG1 de humano e IgG4 de humano. Se conoce la secuencia de aminoácidos de la región constante de las cadenas pesadas de la IgG1 de humano y de la IgG4 de humano. Se han descrito numerosas secuencias de alotipos debidas a polimorfismos genéticos en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, publicación del NIH n.º 91-3242, para la región constante de la IgG1 de humano, y en la presente descripción se puede utilizar cualquiera de estas secuencias.

Las dos variantes de la región Fc asociadas que se incluyen en el polipéptido anteriormente mencionado pueden ser variantes de la región Fc introducidas con la misma alteración o alteraciones aminoacídicas (de aquí en adelante, se le denominará un polipéptido que contiene variantes de regiones Fc homólogas) o variantes de la región Fc que comprenden diferentes secuencias de aminoácidos, en donde a cada una se le han introducido diferentes alteraciones aminoacídicas o, como alternativa, variantes de la región Fc que comprenden diferentes secuencias de aminoácidos, donde solo a una de las regiones Fc se le han introducido alteraciones aminoacídicas (de aquí en adelante, se le denominará un polipéptido que contiene variantes de regiones Fc heterólogas). Como la alteración de aminoácido a introducir en solo una de las regiones Fc, se prefiere la alteración en la porción con la estructura de lazo desde las posiciones 233 a 239 (numeración EU) del dominio CH2 de la región Fc implicada en la fijación al FcγRIIb y al FcγRIIa; y, preferiblemente, se le introduce una alteración que realza la actividad de fijación al FcγRIIb y/o que realza la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R) de la estructura de lazo de la región CH2 de una de las regiones Fc, y se le introduce una alteración de aminoácido que desestabiliza la estructura de lazo de la región CH2 de la otra región Fc. Los ejemplos de alteraciones aminoacídicas que pueden desestabilizar la estructura de lazo de la región CH2 pueden ser la sustitución de al menos un aminoácido seleccionado de los aminoácidos en las posiciones 235, 236, 237, 238 y 239 por otro aminoácido. Específicamente, la estructura de lazo de la región CH2 se puede desestabilizar, por ejemplo, mediante la alteración del aminoácido de la posición 235 en Asp, Gln, Glu o Thr, mediante la alteración del aminoácido de la posición 236 en Asn, mediante la alteración del aminoácido de la posición 237 en Phe o Trp, mediante la alteración del aminoácido de la posición 238 en Glu, Gly o Asn, y mediante la alteración del aminoácido de la posición 239 en Asp o Glu, de acuerdo con la numeración EU.

Para producir un polipéptido que comprende variantes de regiones Fc heterólogas descritas en la presente memoria, se requiere que estén asociadas las variantes de la región Fc que tiene aminoácidos que difieren unos de otros, o un polipéptido que comprende variantes de regiones Fc heterólogas de interés se separe de otros polipéptidos que comprenden las variantes de regiones Fc homólogas.

Para la asociación de los polipéptidos que tienen diferentes aminoácidos entre sí, se puede aplicar una técnica para suprimir la asociación accidental entre las cadenas H mediante la introducción de repulsión electrostática en la interfase de la segunda región constante de la cadena H del anticuerpo (CH2) o de la tercera región constante de la cadena H (CH3) (solicitud de patente internacional WO 2006/106905).

En la tecnología de supresión de la asociación accidental entre las cadenas H por introducción de la repulsión electrostática en la interfase de CH2 o CH3, los ejemplos de restos aminoacídicos en contacto en la interfase de otras regiones constantes de la cadena H incluyen el resto de la posición 356 (numeración EU), el resto de la posición 439 (numeración EU), la región que da al resto de la posición 357 (numeración EU), el resto de la posición 370 (numeración EU), el resto de la posición 399 (numeración EU) y el resto de la posición 409 (numeración EU) en el dominio CH3.

Más específicamente, por ejemplo, en un anticuerpo que contiene dos tipos de dominios CH3 de cadena H, se puede producir el anticuerpo en el cual de una a tres parejas de restos aminoacídicos seleccionados de los restos aminoacídicos mostrados a continuación en (1) a (3) en el primer dominio CH3 de la cadena H tiene el mismo tipo de carga:

(1) restos aminoacídicos en las posiciones 356 y 439 (numeración EU) que son restos aminoacídicos contenidos en el dominio CH3 de la cadena H;

(2) restos aminoacídicos en las posiciones 357 y 370 (numeración EU) que son restos aminoacídicos contenidos en el dominio CH3 de la cadena H; y

(3) restos aminoacídicos en las posiciones 399 y 409 (numeración EU) que son restos aminoacídicos contenidos en el dominio CH3 de la cadena H;

Además, se puede producir un anticuerpo en el cual de una a tres parejas de restos aminoacídicos que corresponden a las parejas de restos aminoacídicos indicadas más arriba en (1) a (3) que tienen el mismo tipo de carga en el primer

dominio CH3 de la cadena H tienen cargas opuestas a la de los correspondientes restos aminoacídicos en el primer dominio CH3 de la cadena H anteriormente mencionado, en donde las parejas de restos aminoacídicos se seleccionan de las parejas de restos aminoacídicos indicados más arriba en (1) a (3) en el segundo dominio CH3 de la cadena H que difiere del primer dominio CH3 de la cadena H.

Los correspondientes restos aminoacídicos de (1) a (3) mencionados más arriba se colocan cerca unos de los otros cuando están asociados. Los expertos en la técnica pueden encontrar sitios que corresponden a los restos aminoacídicos mencionados más arriba de (1) a (3) mediante modelización por homología y similares con un programa informático comercial para la región constante de la cadena H o el dominio CH3 de la cadena H que se desea, y los restos aminoacídicos de estos sitios se pueden alterar cuando sea adecuado.

En los anticuerpos mencionados más arriba, por ejemplo, los «restos aminoacídicos cargados» se seleccionan preferiblemente de restos aminoacídicos incluidos en cualquiera de los grupos (X) o (Y) que vienen a continuación:

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

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

En los anticuerpos mencionados más arriba, la frase «que tiene el mismo tipo de carga» significa que, por ejemplo, los dos o más restos aminoacídicos son restos aminoacídicos incluidos en cualquiera de los grupos anteriormente mencionados (X) e (Y). La frase «que tiene la carga opuesta» significa que, por ejemplo, cuando al menos uno de los dos o más restos aminoacídicos es un resto aminoacídico incluido en cualquiera de los grupos anteriormente mencionados (X) e (Y), los restantes restos aminoacídicos son restos aminoacídicos incluidos en el otro grupo.

En un aspecto preferido del anticuerpo mencionado más arriba, el primer dominio CH3 de la cadena H y el segundo dominio CH3 de la cadena H pueden quedar conectados mediante puentes disulfuro.

En la presente memoria, los restos aminoacídicos a alterar no se limitan a los restos aminoacídicos de la región constante del anticuerpo ni de la región variable del anticuerpo descritos más arriba. Los expertos en la técnica pueden encontrar restos aminoacídicos que forman la interfase en los mutantes de polipéptidos o heteromultímeros a través de la modelización por homología y similares mediante el uso de un programa informático comercial, y pueden alterar los restos aminoacídicos en esos sitios para regular la asociación.

Se pueden utilizar otras técnicas conocidas adicionalmente para la asociación de variantes de regiones Fc heterólogas. Específicamente, tal técnica se realiza mediante la sustitución de una cadena lateral de aminoácido presente en una región variable de una de las cadenas H en un anticuerpo por una cadena lateral más grande (espiga; que significa «protuberancia») y mediante la sustitución de una cadena lateral de aminoácido presente en una región variable de la otra cadena H por una cadena lateral más pequeña (caja; que significa «vacío»), para colocar la espiga dentro de la caja. Esto puede promover la asociación eficaz entre los polipéptidos que contienen la región Fc que tienen diferentes aminoácidos (solicitud de patente internacional WO 1996/027011; Ridgway J. B. et al., *Protein Engineering* (1996) 9, 617-621; Merchant A. M. et al., *Nature Biotechnology* (1998) 16, 677-681).

Además, se pueden utilizar también otras técnicas conocidas para la asociación heteróloga de variantes de la región Fc. La asociación de los polipéptidos que tienen diferentes secuencias se puede inducir con eficacia mediante la asociación complementaria de CH3 con el uso de un dominio CH3 creado artificialmente por intercambio de hebras producido por el cambio de una porción de uno de los CH3 de la cadena H de un anticuerpo por una secuencia procedente de IgA que corresponde a esa porción y la introducción en la porción complementaria del otro dominio CH3 de la cadena H, una secuencia procedente de IgA que corresponde a esa porción (*Protein Engineering Design & Selection*, 23; 195-202, 2010). Esta técnica conocida también se puede utilizar para inducir con eficacia una asociación entre los polipéptidos que contienen la región Fc que tienen diferentes aminoácidos cada uno de ellos.

Además, se pueden utilizar también las técnicas de producción de anticuerpos heterodimerizados que utilizan la asociación de CH1 y CL del anticuerpo, y la asociación de VH y VL, que se describen en la solicitud de patente internacional WO2011/028952.

Al igual que con el método descrito en las solicitudes de patente internacional WO2008/119353 y WO2011/131746, también es posible utilizar la técnica de producir anticuerpos heterodimerizados mediante la producción de dos tipos de anticuerpos homodimerizados con antelación, la incubación de los mismos en condiciones reductoras para disociarlos, y dejarlos que se asocien de nuevo.

Al igual que con el método descrito en *J. Mol*. (2012) 420, 204-219, también es posible utilizar la técnica de producir anticuerpos heterodimerizados mediante la introducción de restos cargados, tales como Lys, Arg, Glu y Asp, de tal forma que la repulsión electrostática se introduce en el CH3 de IgG1 e IgG2.

Además, al igual que con el método descrito en la solicitud de patente internacional WO2012/058768, también es posible utilizar la técnica de producción de anticuerpos heterodimerizados mediante la adición de alteraciones en las regiones CH2 y CH3.

Además, incluso en los casos en los que no se pueden formar con eficacia los polipéptidos que comprenden variantes de regiones Fc heterólogas, se pueden obtener polipéptidos que comprenden variantes de regiones Fc heterólogas mediante la separación y la purificación de los polipéptidos que comprenden las variantes de regiones Fc homólogas. Cuando se produce un polipéptido que comprende las variantes de regiones Fc heterólogas que consiste en un primer polipéptido y un segundo polipéptido que tienen secuencias diferentes el uno del otro, se mezclan como impurezas los polipéptidos que comprenden la región Fc homóloga que consiste en solo los dos primeros polipéptidos, y el polipéptido que comprende la región Fc homóloga que consiste en solo los dos segundos polipéptidos. Se pueden utilizar las tecnologías conocidas como método para retirar de forma eficaz estos dos tipos de polipéptidos que comprenden la región Fc homóloga. Se ha descrito un método que es capaz de purificar dos tipos de homodímeros y el anticuerpo heterodimerizado de interés mediante cromatografía de intercambio iónico, mediante la creación de una diferencia en los puntos isoeléctricos mediante la introducción de sustituciones de aminoácidos en las regiones variables de los dos tipos de cadenas H (solicitud de patente internacional WO 2007114325). Hasta la fecha, como método para purificar los anticuerpos heterodimerizados, se ha descrito un método que utiliza la proteína A para purificar un anticuerpo heterodimerizado que comprende una cadena H de IgG2a de ratón que se fija a la proteína A y una cadena H de IgG2b de rata que no se fija a la proteína A (solicitudes de patente internacional WO 98050431 y WO 95033844).

Además, un anticuerpo heterodimerizado aislado puede purificarse con eficacia mediante el uso de cadenas H en las que los restos aminoacídicos en el sitio de fijación de la proteína A a la IgG, posiciones 435 y 436 (numeración EU), están sustituidos por aminoácidos que producen diferentes afinidades por la proteína A, tales como Tyr o His, para cambiar la interacción de cada una de las cadenas H con la proteína A, y con el uso de una columna con la proteína A.

Se pueden utilizar numerosas sustituciones y tecnologías de estas, por ejemplo, se pueden usar en combinación dos o más de ellas. Además, estas alteraciones se pueden realizar por separado en el primer polipéptido y en el segundo polipéptido cuando sea necesario. Los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden ser también los producidos basándose en los productos de las alteraciones mencionadas más arriba.

En la presente memoria, una alteración aminoacídica hace referencia a cualquier sustitución, deleción, adición, inserción y modificación, o a una combinación de las mismas. En la presente memoria, una alteración aminoacídica se puede reformular como mutación de aminoácido, y se utilizan como sinónimos.

Al sustituir restos aminoacídicos, la sustitución en un resto aminoacídico diferente se lleva a cabo con el objeto de alterar aspectos tales como (a)-(c) descritos a continuación:

(a) estructura del esqueleto del polipéptido en la región con la estructura de hoja o con estructura helicoidal;

(b) carga eléctrica o hidrofobia en el sitio diana; o

(c) tamaño de la cadena lateral.

Los restos aminoacídicos se clasifican en los siguientes grupos basándose en las propiedades generales de sus cadenas laterales:

(1) hidrófobo: norleucina, met, ala, val, leu e ile;

(2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr, asn y gln;

(3) ácidos: asp y glu;

(4) básicos: his, lys y arg;

(5) restos que afectan a la orientación de la cadena: gly y pro; y

(6) aromáticos: trp, tyr y phe.

La sustitución entre los restos aminoacídicos dentro de cada uno de estos grupos de aminoácidos se denomina sustitución conservativa y la sustitución de los restos aminoacídicos entre diferentes grupos se denomina sustitución no conservativa. Las sustituciones en la presente descripción pueden ser sustituciones conservativas o sustituciones no conservativas, o una combinación de sustituciones conservativas y sustituciones no conservativas.

Las alteraciones de la secuencia de aminoácidos se generan mediante diferentes métodos conocidos por los expertos en la técnica. Tales métodos incluyen el método de mutagénesis dirigida específica de sitio (Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, y Nakagawa, M. (1995) «An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis». *Gene* 152: 271-275; Zoller, M. J. y Smith, M. (1983) «Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors». *Methods Enzymol*. 100: 468-500; Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, HW, Kramer, B, Pflugfelder, M, y Fritz, HJ (1984) «The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction». *Nucleic Acids Res*. 12: 9441-9456; Kramer W y Fritz HJ (1987) «Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA Methods». *Enzymol*. 154, 350-367; y Kunkel, TA (1985) «Rapid and efficient site-

specific mutagenesis without phenotypic selection». *Proc Natl Acad Sci USA*. 82: 488-492), el método de mutación por PCR y el método de mutación por casete, pero no se limitan a estos.

La modificación de los aminoácidos descrita en la presente memoria incluye la modificación postraduccional. Una modificación postraduccional específica puede ser la adición o deleción de una cadena de polisacárido. Por ejemplo, en la región constante de IgG1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 11, el resto aminoacídico de la posición 297 (numeración EU) puede estar modificado con una cadena de polisacárido. La estructura de la cadena de polisacárido a modificar no está limitada. Por lo general, los anticuerpos expresados en las células eucariotas comprenden la glucosilación en la región constante. Por lo tanto, los anticuerpos expresados en las células tales como las de más adelante suelen estar modificados con algún tipo de cadena de polisacárido:

- células productoras de anticuerpos de mamíferos
- células eucariotas transformadas con un vector de expresión que comprende un ADN que codifica un anticuerpo

Las células eucariotas que se muestran aquí incluyen células de levadura y de animales. Por ejemplo, las células CHO y las células HEK293H son células animales representativas que se utilizan en la transformación con un vector de expresión que comprende un ADN que codifica un anticuerpo. Por otra parte, los que no llevan glucosilación en este sitio también están incluidos en la región constante descrita en la presente memoria. Se pueden obtener anticuerpos cuya región constante no está glucosilada mediante la expresión de un gen que codifica el anticuerpo en las células procariotas tales como *Escherichia coli.*

Específicamente, por ejemplo, se puede añadir ácido siálico a la cadena de polisacárido de una región Fc (*Mabs*. septiembre-octubre de 2010; 2 (5): 519-27).

Por otra parte, también se describen en la presente memoria anticuerpos que comprenden cualquiera de las variantes de la región Fc descritas más arriba.

La terminología «anticuerpo/anticuerpos» en la presente descripción se utiliza en el sentido más amplio, y siempre y cuando presente la actividad biológica deseada, comprende cualquier anticuerpo, tal como los anticuerpos monoclonales (entre ellos, los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, variantes de anticuerpo, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos poliespecíficos (anticuerpos multiespecíficos) (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos (diacuerpos)), anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados.

En cuanto a los anticuerpos descritos en la presente memoria, no están limitados el tipo de antígeno ni el origen del anticuerpo, y pueden ser cualquier tipo de anticuerpo. El origen de los anticuerpos no está particularmente limitado, aunque los ejemplos incluyan anticuerpos humanos, anticuerpos de ratón, anticuerpos de rata y anticuerpos de conejo.

Los métodos para producir los anticuerpos los conocen bien los expertos en la técnica y, por ejemplo, se pueden producir anticuerpos monoclonales mediante el método del hibridoma (Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975)), o con el método de recombinación (patente de los EE. UU. n.º 4 816 567). Como alternativa, se pueden aislar de una colección de anticuerpos en fagos (Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol*. 222: 581-597 (1991)).

Un anticuerpo humanizado también se denomina anticuerpo humano remodelado. Específicamente, se conocen anticuerpos humanizados preparados mediante la inserción de las CDR de un anticuerpo animal no humano, tal como un anticuerpo de ratón, contra un anticuerpo humano y similares. También se conocen las técnicas de ingeniería genética corrientes para obtener anticuerpos humanizados. Específicamente, por ejemplo, se conoce la PCR de extensión por solapamiento como un método para injertar las CDR de anticuerpo de ratón en las FR de humano.

Se puede producir un vector que exprese un anticuerpo humanizado mediante la inserción de un ADN que codifica una región variable de anticuerpo en la que están ligadas tres CDR y cuatro FR, y un ADN que codifica una región constante de anticuerpo humano en un vector de expresión de tal forma que estos ADN están fusionados en fase. Después de que este vector de integración se transfecte en un hospedador para consolidar las células recombinantes, se cultivan estas células y se expresa el ADN que codifica el anticuerpo humanizado para que produzca el anticuerpo humanizado en el cultivo de las células (véase la publicación de patente europea n.º EP 239 400 y la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 1996/002576).

Cuando sea necesario, se puede sustituir un resto aminoacídico en una FR de tal forma que las CDR de un anticuerpo humano remodelado formen un sitio de fijación al antígeno idóneo. Por ejemplo, se puede introducir una mutación en la secuencia aminoacídica de una FR mediante la aplicación del método de PCR utilizado para injertar las CDR de ratón en las FR humanas.

Se puede obtener un anticuerpo humano deseado mediante inmunización con ADN con el uso de un animal transgénico que tiene el repertorio completo de genes para los anticuerpos de humano (véanse las publicaciones de solicitud de patente internacional n.os WO 1993/012227, WO 1992/003918, WO 1994/002602, WO 1994/025585, WO 1996/034096 y WO 1996/033735) como un animal para la inmunización.

Por otra parte, se conocen las tecnologías con las que obtener un anticuerpo humano mediante rondas de criba con el uso de una colección de anticuerpos humanos. Por ejemplo, se expresa una región V de anticuerpo humano sobre la superficie de un fago como un anticuerpo monocatenario (scFv) mediante el método de presentación en fagos. Se puede seleccionar el fago que expresa el scFv que se fija al antígeno. La secuencia de ADN que codifica la región V del anticuerpo humano fijado al antígeno se puede determinar mediante el análisis de los genes del fago seleccionado. Después de determinar la secuencia de ADN del scFv que se fija al antígeno, se puede preparar un vector de expresión mediante la fusión de la secuencia de la región V en fase con la secuencia de una región C del anticuerpo humano deseado y, a continuación, con la introducción de esto en un vector de expresión idóneo. El vector de expresión se introduce en las células de expresión idóneas, tales como las descritas más arriba, y el anticuerpo humano se puede obtener mediante la expresión del gen que codifica el anticuerpo humano. Estos métodos ya se conocen (véanse las publicaciones de solicitud de patente internacional n.os WO 1992/001047, WO 1992/020791, WO 1993/006213, WO 1993/011236, WO 1993/019172, WO 1995/001438 y WO 1995/15388).

Las regiones variables que constituyen los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden ser regiones variables que reconocen cualquier antígeno.

En la presente memoria no hay ninguna limitación particular sobre el antígeno y puede ser cualquier antígeno. Los ejemplos de tales antígenos incluyen preferiblemente ligandos (citocinas, quimiocinas y similares), receptores, antígenos del cáncer, antígeno del CMH, antígenos de diferenciación, inmunoglobulinas y complejos inmunitarios que contienen parcialmente inmunoglobulinas.

Los ejemplos de citocinas incluyen las interleucinas 1 a 18, factores estimuladores de colonias (G-CSF, M-CSF, GM-CSF, etc.), interferones (IFN-α, IFN-β, IFN-γ, etc.), factores de crecimiento (EGF, FGF, IGF, NGF, PDGF, TGF, HGF, etc.), factores de la necrosis tumoral (TNF-α y TNF-β), linfotoxina, eritropoyetina, leptina, SCF, TPO, MCAF y BMP.

Los ejemplos de quimiocinas incluyen quimiocinas CC, tales como CCL1 a CCL28, quimiocinas CXC tales como CXCL1 a CXCL17, quimiocinas C, tales como XCL1 a XCL2, y quimiocinas CX3C tales como CX3CL1.

Los ejemplos de receptores incluyen receptores que pertenecen a las familias de receptores tales como la familia de receptores del factor de crecimiento hematopoyético, la familia de receptores de citocinas, la familia de receptores de tipo tirosina cinasa, la familia de receptores de tipo serina/treonina cinasa, la familia de receptores de TNF, la familia de receptores acoplados a proteínas G, la familia de receptores de tipo ancla de GPI, la familia de receptores de tipo tirosina fosfatasa, la familia de factores de adherencia y la familia de receptores de hormonas. Los receptores que pertenecen a estas familias de receptores y sus características se han descrito en muchos documentos, tales como Cooke BA, King RJB, van der Molen HJ. ed. *New Comprehesive Biochemistry* Vol.18B «Hormones and their Actions Part II» págs. 1-46 (1988) Elsevier Science Publishers BV; Patthy (*Cell* (1990) 61 (1): 13-14); Ullrich et al. (*Cell* (1990) 61 (2): 203-212); Massagué (*Cell* (1992) 69 (6): 1067-1070); Miyajima et al. (*Annu. Rev. Immunol*. (1992) 10: 295-331); Taga et al. (*FASEB J*. (1992) 6, 3387-3396); Fantl et al. (*Annu. Rev. Biochem*. (1993), 62: 453-481); Smith et al. (*Cell* (1994) 76 (6): 959-962); y Flower DR. Flower (*Biochim. Biophys. Acta* (1999) 1422 (3): 207-234).

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

Los antígenos del cáncer son antígenos que se expresan cuando las células se vuelven malignas y también se denominan antígenos específicos del tumor. También son antígenos del cáncer las cadenas de azúcares anormales que aparecen sobre la superficie de las células o las moléculas de proteína cuando las células se vuelven cancerosas, y también se denominan cadenas de polisacárido antigénicas del cáncer. Los ejemplos de antígenos del cáncer incluyen preferiblemente el GPC3 que es un receptor que pertenece a la familia de receptores de tipo ancla de GPI mencionada más arriba, y también se expresa en varios cánceres, entre ellos el cáncer de hígado (*Int J Cancer*. (2003) 103 (4): 455-65) así como el EpCAM que se expresa en varios cánceres, entre ellos el cáncer de pulmón (*Proc Natl Acad Sci USA.* (1989) 86 (1): 27-31), CA19-9, CA15-3 y sialilo SSEA-1 (SLX).

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

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

Las inmunoglobulinas incluyen IgA, IgM, IgD, IgG e IgE. Los complejos inmunitarios incluyen un componente de al menos cualquiera de las inmunoglobulinas.

Otros antígenos incluyen, por ejemplo, las moléculas siguientes: 17-IA, 4-1BB, 4Dc, 6-ceto-PGF1a, 8-iso-PGF2a, 8-oxo-dG, receptor de la adenosina A1, A33, ACE, ACE-2, activina, activina A, activina AB, activina B, activina C, activina RIA, activina RIA ALK-2, activina RIB ALK-4, activina RIIA, activina RIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, adresina, aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, α-1-antitripsina, antagonista α-V/β-1, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, ARC, ART, artemina, anti-Id, ASPARTIC, péptido natriurético auricular, integrina av/b3, Axl, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, factor estimulante de los linfocitos B (BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2 BMP-2a, BMP-3 osteogenina, BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II (BRK-3), BMP, b-NGF, BOK, bombesina, factor neurótrofo procedente de hueso, BPDE, BPDE-DNA, BTC, factor 3 del complemento (C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, calcitonina, AMPc, antígeno carcinoembrionario (ACE), antígeno asociado al cáncer, catepsina A, catepsina B, catepsina C/DPPI, catepsina D, catepsina E, catepsina H, catepsina L, catepsina O, catepsina S, catepsina V, catepsina X/Z/P, CBL, CCI, CCK2, CCL, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR, CCR1, CCR10, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33 (proteína p67), CD34, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80 (B7-1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, cGMP, CINC, toxina botulínica, toxina de *Clostridium perfringens*, CKb8-1, CLC, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, antígeno citoqueratínico asociado al tumor, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, factor regulador del complemento (factor acelerador de desaparición), des (1-3)-IGF-I (IGF-1 del cerebro), Dhh, digoxina, DNAM-1, Dnasa, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), EMA, EMMPRIN, ENA, receptor de la endotelina, encefalinasa, eNOS, Eot, eotaxina 1, EpCAM, efrina B2/EphB4, EPO, ERCC, selectina E, ET-1, factor IIa, factor VII, factor VIIIc, factor IX, proteína de activación de fibroblastos (FAP), Fas, FcR1, FEN-1, ferritina, FGF, FGF-19, FGF-2, FGF3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, fibrina, FL, FLIP, Flt-3, Flt-4, hormona foliculoestimulante, fractalquina, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14, CDMP-1), GDF-6 (BMP-13, CDMP-2), GDF-7 (BMP-12, CDMP-3), GDF-8 (miostatina), GDF-9, GDF-15 (MIC-1), GDNF, GDNF, GFAP, GFRa-1, GFR-αl, GFR-α2, GFR-α3, GITR, glucagón, Glut4, glucoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, hormona liberadora de la hormona del crecimiento, hapteno (NP-cap o NIP-cap), HB-EGF, HCC, glucoproteína gB de la envoltura del HCMV, glucoproteína gH de la envoltura del HCMV , HCMV UL, factor de crecimiento hematopoyético (HGF), Hep B gp120, heparanasa, Her2, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), glucoproteína gB del virus del herpes simple (HSV), glucoproteína gD del HSV, HGFA, antígeno asociado al melanoma de alta masa molecular (HMW-MAA), gp120 del HIV , lazo V3 de gp120 IIIB del HIV, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMFG PEM, HRG, Hrk, miosina cardíaca humana, citomegalovirus humano (HCMV), hormona del crecimiento humana (HGH), HVEM, 1-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, receptor de IgA, IgE, IGF, proteína de fijación a IGF, IGF-1R, IGFBP, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-18R, IL-23, interferón (INF)-α, INF-β, INF-γ, inhibina, iNOS, cadena A de la insulina, cadena B de la insulina, factor 1 de crecimiento de tipo insulina, integrina α2, integrina α3, integrina α4, integrina α4/βl, integrina α4/β7, integrina α5 (α V), integrina α5/βl, integrina α5/β3, integrina α6, integrina β1, integrina β2,interferón γ, IP-10, I-TAC, JE, calicreína 2, calicreína 5, calicreína 6, calicreína 11, calicreína 12, calicreína 14, calicreína 15, calicreína L1, calicreína L2, calicreína L3, calicreína L4, KC, KDR, factor del crecimiento de los queratinocitos (KGF), laminina 5, LAMP, LAP, LAP (TGF-1), TGF-1 latente, TGF-1 bp1 latente, LBP, LDGF, LECT2, lefty, antígeno Y de Lewis, antígeno asociado a Y de Lewis, LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, lipoproteína, LIX, LKN, Lptn, selectina L, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, superficie pulmonar, hormona luteinizante, receptor de la linfotoxina β, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCAM, MCK-2, MCP, M-CSF, MDC, Mer, metaloproteasas, receptor del MGDF, MGMT, MHC (HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-α, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MPIF, Mpo, MSK, MSP, mucina (Muc1), MUC18, sustancia inhibidora muleriana, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, adherina N-C, NCA 90, NCAM, NCAM, neprilisina, neurotrofina-3, -4, o -6, neurturina, factor del crecimiento de los nervios (NGF), NGFR, NGF-β, nNOS, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L, OX40R, p150, p95, PADPr, hormona paratiroidea, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, cadherina P, PCNA, PDGF, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIN, PLA2, fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), PlGF, PLP, PP14, proinsulina, prorrelaxina, proteína C, PS, PSA, PSCA, antígeno de la membrana específico

de la próstata (PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, cadena A de la relaxina, cadena B de la relaxina, renina, virus sincitial respiratorio (RSV) F, Fgp del RSV , Ret, factor reumatoide, RLIP76, RPA2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, SERINE, seroalbúmina, sFRP-3, Shh, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72 (glucoproteína 72 asociada al tumor), TARC, TCA-3, receptor de linfocitos T (por ejemplo, receptor α/β de los linfocitos T), TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, fosfatasa alcalina de tipo PLAP de los testículos, TfR, TGF, TGF-α, TGF-β, TGF-β panespecífico, TGF-βRI (ALK-5), TGF-βRII, TGF-βRIIb, TGF-βRIII, TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4, TGF-β5, trombina, Ck-1 del timo, hormona estimulante del tiroides, Tie, TIMP, TIQ, factor tisular, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, TNF-α, TNF-αβ, TNF-β2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2, DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5, KILLER, TRICK-2A, TRICK-B), TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1, LIT, TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2, TRUNDD), TNFRSF11A (RANK ODF R, TRANCE R), TNFRSF11B (OPG OCIF, TR1), TNFRSF12 (TWEAK R FN14), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFFR), TNFRSF14 (HVEM ATAR, HveA, LIGHT R, TR2), TNFRSF16 (NGFR p75NTR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR AITR), TNFRSF19 (TROY TAJ, TRADE), TNFRSF19L (RELT), TNFRSF1A (TNF RI CD120a, p55-60), TNFRSF1B (TNF RII CD120b, p75-80), TNFRSF26 (TNFRH3), TNFRSF3 (LTbR TNF RIII, TNFC R), TNFRSF4 (OX40 ACT35, TXGP1 R), TNFRSF5 (CD40 p50), TNFRSF6 (Fas Apo-1, APT1, CD95), TNFRSF6B (DcR3 M68, TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1BB CD137, ILA), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFRSF25 (DR3 Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-1), TNFSF10 (ligando de TRAIL Apo-2, TL2), TNFSF11 (ligando de ODF de TRANCE/RANK, ligando de OPG), TNFSF12 (ligando de TWEAK Apo-3, ligando de DR3), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS, TALL1, THANK, TNFSF20), TNFSF14 (ligando de LIGHT HVEM, LTg), TNFSF15 (TL1A/VEGI), TNFSF18 (ligando de GITR, ligando de AITR, TL6), TNFSF1A (TNF-a Conectina, DIF, TNFSF2), TNFSF1B (TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC, p33), TNFSF4 (ligando gp34 de OX40, TXGP1), TNFSF5 (ligando CD154 de CD40, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6 (ligando de Fas ligando de Apo-1, ligando de APTI), TNFSF7 (ligando CD70 de CD27), TNFSF8 (ligando CD153 de CD30), TNFSF9 (ligando de 4-1BB ligando de CD137), TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, receptor de la transferrina, TRF, Trk, TROP-2, TSG, TSLP, antígeno CA125 asociado al tumor, glúcidos asociados a Y de Lewis que expresan el antígeno asociado al tumor, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, urocinasa, VCAM, VCAM-1, VECAD, cadherina VE, VE-cadherina-2, VEFGR-1 (flt-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3 (flt-4), VEGI, VIM, antígeno de virus, VLA, VLA-1, VLA-4, integrina de VNR, factor de von Willebrand, WIF-1, WNT1, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD, HMGB1, IgA, Aβ, CD81, CD97, CD98, DDR1, DKK1, EREG, Hsp90, IL-17/IL-17R, IL-20/IL-20R, LDL oxidada, PCSK9, precalicreína, RON, TMEM16F, SOD1, cromogranina A, cromogranina B, tau, VAP1, cininógeno de masa molecular alta, IL-31, IL-31R, Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Navl.4, Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9, EPCR, C1, C1q, C1r, C1s, C2, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4a, C4b, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9, factor B, factor D, factor H, properdina, esclerostina, fibrinógeno, fibrina, protrombina, trombina, factor tisular, factor V, factor Va, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor VIIIa, factor IX, factor IXa, factor X, factor Xa, factor XI, factor XIa, factor XII, factor XIIa, factor XIII, factor XIIIa, TFPI, antitrombina III, EPCR, trombomodulina, TAPI, tPA, plasminógeno, plasmina, PAI-1, PAI-2, GPC3, Sindecán 1, Sindecán 2, Sindecán 3, Sindecán 4, LPA y S1P; y receptores para hormonas y factores de crecimiento.

Se permiten una o varias alteraciones de los restos aminoacídicos en las secuencias de aminoácidos que constituyen las regiones variables siempre y cuando se les mantenga la actividad de fijación al antígeno. Cuando se altera una secuencia de aminoácidos en la región variable, no hay particularmente ninguna limitación en el sitio de la alteración ni en el número de aminoácidos alterados. Por ejemplo, los aminoácidos presentes en la CDR y/o en la FR se puede alterar de manera adecuada. Cuando se alteran los aminoácidos en una región variable, se mantiene la actividad de fijación preferiblemente sin ninguna limitación particular; y, por ejemplo, en comparación con la alteración anterior, la actividad de fijación es del 50% o más, preferiblemente del 80% o más, y más preferiblemente del 100% o más. Además, la actividad de fijación se puede incrementar mediante alteraciones de los aminoácidos. Por ejemplo, la actividad de fijación puede ser 2, 5 o 10 veces mayor, o similar, que la alteración anterior. En los anticuerpos de la presente descripción, la alteración de la secuencia de aminoácidos puede ser al menos una de sustitución, adición, deleción y modificación de algún resto aminoacídico.

Por ejemplo, la modificación de la glutamina del extremo amino de una región variable en ácido piroglutámico mediante la piroglutamilación es una modificación que los expertos en la técnica conocen bien. Así pues, cuando el extremo amino de la cadena pesada es glutamina, los anticuerpos descritos en la presente memoria comprenden las regiones variables en las que la glutamina está modificada en ácido piroglutámico.

Las regiones variables de los anticuerpos descritas en la presente memoria pueden tener cualquier secuencia y pueden ser las regiones variables de anticuerpos de cualquier origen, tales como anticuerpos de ratón, anticuerpos de rata, anticuerpos de conejo, anticuerpos de cabra, anticuerpos de camello, anticuerpos humanizados producidos al humanizar estos anticuerpos no humanos, y anticuerpos de humano. «Anticuerpos humanizados», también denominados «anticuerpos humanos remodelados», son anticuerpos en los que las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo procedente de un mamífero no humano, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se transplantan en las CDR de un anticuerpo humano. Se conocen los métodos para identificar las CDR (Kabat et al., *Sequence of Proteins of Immunological Interest* (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chothia et al., *Nature* (1989) 342: 877). También se conocen las técnicas habituales para su recombinación genética (véase la publicación de solicitud de patente europea n.º EP 125023 y la solicitud de patente internacional WO 96/02576).

Además, estos anticuerpos pueden tener diferentes sustituciones de aminoácidos introducidas en la región variable para mejorar su fijación al antígeno, la farmacocinética, la estabilidad y la inmunogenia. Las regiones variables de los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden ser capaces de fijarse a antígenos repetidas veces debido a que la fijación al antígeno depende del pH (solicitud de patente internacional WO 2009/125825).

Las regiones constantes de tipo cadena κ y de tipo cadena λ están presentes en las regiones constantes de la cadena ligera del anticuerpo, pero no resulta aceptable ninguna de las regiones constantes de las cadenas ligeras. Además, las regiones constantes de las cadenas ligeras descritas en la presente memoria pueden ser regiones constantes de las cadenas ligeras con alteraciones de aminoácidos tales como sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones.

Por ejemplo, para las regiones constantes de las cadenas pesadas de un anticuerpo descrito en la presente memoria, se pueden utilizar las regiones constantes de las cadenas pesadas de los anticuerpos de tipo IgG de humano y se prefieren las regiones constantes de las cadenas pesadas de los anticuerpos del tipo IgG1 de humano y las de los anticuerpos del tipo IgG4 de humano.

Además, las variantes de la región Fc descritas en la presente memoria se pueden fabricar en moléculas de proteínas de fusión con Fc mediante la unión a otras proteínas, péptidos fisiológicamente activos y similares. En la presente memoria, proteína de fusión hace referencia a un polipéptido quimérico que comprende al menos dos polipéptidos diferentes, que no se unen espontáneamente el uno al otro de forma natural. Los ejemplos de otras proteínas y péptidos biológicamente activos incluyen receptores, moléculas de adherencia, ligandos y enzimas, pero no se limitan a estos.

Loe ejemplos preferidos de moléculas de la proteína de fusión con Fc descritas en la presente memoria incluyen proteínas con la región Fc fusionada a una proteína receptora que se fija a una diana, y tales ejemplos incluyen la proteína de fusión TNFR-Fc, la proteína de fusión IL1R-Fc, la proteína de fusión VEGFR-Fc, y la proteína de fusión CTLA4-Fc (*Nat Med*. de enero del 2003; 9 (1): 47-52; *BioDrugs*. 2006; 20 (3): 151-60). Además, una proteína que se ha de fusionar con un polipéptido descrito en la presente memoria puede ser cualquier molécula, siempre y cuando se fije a una molécula destinataria, y los ejemplos incluyen moléculas de tipo scFv (solicitud de patente internacional WO 2005/037989), moléculas de anticuerpo con un solo domino (solicitud de patente internacional WO 2004/058821; solicitud de patente internacional WO 2003/002609), moléculas de tipo anticuerpo (*Current Opinion in Biotechnology* 2006, 17: 653-658; *Current Opinion in Biotechnology* 2007, 18: 1-10; *Current Opinion in Structural Biology* 1997, 7: 463-469; y *Protein Science* 2006, 15: 14-27) tales como DARPins (solicitud de patente internacional WO 2002/020565), Affibody (solicitud de patente internacional WO 1995/001937), Avimer (solicitud de patente internacional WO 2004/044011; solicitud de patente internacional WO 2005/040229) y Adnectin (solicitud de patente internacional WO 2002/032925). Además, los anticuerpos y las moléculas de proteínas de fusión con Fc pueden ser anticuerpos multiespecíficos que se fijan a numerosos tipos de moléculas destinatarias o epítopos.

Por otra parte, los anticuerpos descritos en la presente memoria incluyen productos de modificación de anticuerpos. Tales productos de modificación de anticuerpos incluyen, por ejemplo, anticuerpos unidos a diferentes moléculas, tales como polietilenglicol (PEG) y sustancias citotóxicas. Tales productos de modificación de anticuerpos se pueden obtener mediante los anticuerpos modificados químicamente descritos en la presente memoria. Los métodos para modificar anticuerpos ya están consolidados en este campo.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria también pueden ser anticuerpos biespecíficos. «Anticuerpo biespecífico» se refiere a un anticuerpo que tiene en una única molécula regiones variables que reconocen diferentes epítopos. Los epítopos pueden estar presentes en una sola molécula o en diferentes moléculas.

Los polipéptidos descritos en la presente memoria se pueden preparar mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden preparar los anticuerpos mediante los métodos descritos más adelante, pero los métodos no se limitan a ellos.

Se expresan un ADN que codifica una cadena pesada de anticuerpo en la que uno o más restos aminoacídicos en la región Fc han sido sustituidos por otros aminoácidos de interés, y un ADN que codifica una cadena ligera de un anticuerpo. Se puede preparar un ADN que codifica una cadena pesada en la que uno o varios restos aminoacídicos en la región Fc están sustituidos por otros aminoácidos de interés mediante, por ejemplo, la obtención de un ADN que codifica la región Fc de una cadena pesada natural, y la introducción de una sustitución adecuada de tal modo que un codón que codifica un aminoácido concreto en la región Fc codifique otro aminoácido de interés.

Como alternativa, también se puede preparar por diseño un ADN que codifica una cadena pesada en la que uno o varios restos aminoacídicos en la región Fc están sustituidos por otros aminoácidos de interés, y a continuación se sintetiza químicamente un ADN que codifica una proteína en la que uno o varios restos aminoacídicos en la región Fc de la cadena pesada natural están sustituidos por otros aminoácidos de interés. La posición y el tipo de sustitución aminoacídica no están en particular limitados. Además, la alteración no está limitada a la sustitución y la alteración puede ser cualquiera de deleción, adición o inserción, o una combinación de las mismas.

Como alternativa, se puede usar una combinación de ADN parciales para preparar un ADN que codifica una cadena pesada en la que uno o más restos aminoacídicos en la región Fc están sustituidos por otros aminoácidos de interés. Tales combinaciones de ADN parciales incluyen, por ejemplo, la combinación de un ADN que codifica una región

variable y un ADN que codifica una región constante, y la combinación de un ADN que codifica una región Fab y un ADN que codifica una región Fc, pero no se limitan a ellas. Además, un ADN que codifica una cadena ligera se puede preparar de manera parecida como una combinación de ADN parciales.

Los métodos para expresar los ADN descritos más arriba incluyen los métodos que se describen a continuación. Por ejemplo, un vector de expresión de la cadena pesada se construye mediante la inserción de un ADN que codifica una región variable de la cadena pesada en un vector de expresión junto con un ADN que codifica una región constante de la cadena pesada. Asimismo, un vector de expresión de la cadena ligera se construye mediante la inserción de un ADN que codifica una región variable de la cadena ligera en un vector de expresión junto con un ADN que codifica una región constante de la cadena ligera. Como alternativa, estos genes de las cadenas pesada y ligera se pueden insertar en un único vector.

Cuando se inserta un ADN que codifica el anticuerpo de interés en un vector de expresión, el ADN se inserta de tal modo que el anticuerpo se expresa bajo el control de una región reguladora de la expresión, tal como un potenciador o un promotor. A continuación, las células hospedadoras se transforman con este vector de expresión para que se exprese el anticuerpo. En tales casos, se puede utilizar una combinación adecuada de hospedador y vector de expresión.

Los ejemplos de vectores incluyen vectores M13, vectores pUC, pBR322, pBluescript y pCR-Script. Como alternativa, cuando el objetivo es subclonar y escindir el ADNc, se pueden utilizar, además de los vectores descritos más arriba, pGEM-T, pDIRECT, pT7 y similares.

Los vectores de expresión son particularmente útiles cuando se utilizan vectores para producir los polipéptidos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, cuando una célula hospedadora es *E. coli,* tal como JM109, DH5α, HB101 y XL1-Blue, los vectores de expresión deben llevar un promotor que permite la expresión eficaz en *E. coli,* por ejemplo, el promotor de *lacZ* (Ward et al., *Nature* (1989) 341: 544-546; *FASEB J*. (1992) 6: 2422-2427), el promotor de *araB* (Better et al., *Science* (1988) 240: 1041-1043;), el promotor de T7, o similares. Tales vectores incluyen pGEX-5X-1 (Pharmacia), «QIAexpress system» (QIAGEN), pEGFP o pET (en este caso, el hospedador es preferiblemente BL21 que expresa la ARN polimerasa de T7) además de los vectores descritos más arriba.

Los vectores pueden contener la secuencia señal para la secreción de los polipéptidos. Como secuencia señal para la secreción de polipéptidos, se puede utilizar una secuencia señal de pelB (Lei, S. P. et al *J. Bacteriol*. (1987) 169: 4379) cuando se secreta un polipéptido en el periplasma de *E. coli*. El vector se puede introducir en las células hospedadoras mediante el método de la lipofectina, el método de fosfato de calcio y el método de DEAE-dextrano, por ejemplo.

Además de los vectores de expresión de *E. coli*, los vectores para producir los polipéptidos descritos en la presente memoria incluyen vectores de expresión de mamífero (por ejemplo, pcDNA3 (Invitrogen), pEGF-BOS (*Nucleic Acids Res*. 1990, 18 (17): p5322), pEF y pCDM8), vectores de expresión procedentes de células de insecto (por ejemplo, el «sistema de expresión del baculovirus Bac-a-BAC» (GIBCO-BRL) y pBacPAK8), vectores de expresión procedentes de plantas (por ejemplo, pMH1 y pMH2), vectores de expresión procedentes de virus de animales (por ejemplo, pHSV, pMV y pAdexLcw), vectores de expresión retrovíricos (por ejemplo, pZIPneo), vectores de expresión de levaduras (por ejemplo, «Kit de expresión Pichia» (Invitrogen), pNV11 y SP-Q01), y vectores de expresión de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pPL608 y pKTH50), por ejemplo.

Cuando se persigue la expresión en las células de animales, tales como células CHO, COS y NIH3T3, los vectores deben tener un promotor esencial para la expresión en las células, por ejemplo, el promotor del SV40 (Mulligan et al., *Nature* (1979) 277: 108), promotor del MMTV-LTR, promotor del EF1α (Mizushima et al., *Nucleic Acids Res*. (1990) 18: 5322), promotor de CAG (*Gene*. (1990) 18: 5322), y el promotor del CMV, y más preferiblemente tienen un gen para seleccionar las células transformadas (por ejemplo, un gen de resistencia farmacológica que permite la evaluación mediante un agente (neomicina, G418 o similares)). Los vectores con tales características incluyen, por ejemplo, pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV y pOP13.

Además, se puede utilizar el siguiente método para que la expresión del gen y el número de copias del gen sean estables en las células: a las células CHO deficientes en una vía de síntesis de ácidos nucleicos se les introduce un vector que lleva un gen de DHFR que compensa la deficiencia (por ejemplo, pCHOI) y se amplifica el vector con metotrexato (MTX). Como alternativa, se puede utilizar el método que viene a continuación para la expresión transitoria de genes: las células COS con un gen que expresa el antígeno T de SV40 en su cromosoma se transforman con un vector con un origen de replicación de SV40 (pcD y similares). También se pueden utilizar orígenes de replicación procedentes de virus del polioma, adenovirus, virus del papiloma bovino (BPV) y similares. Para amplificar el número de copias del gen en las células hospedadoras, los vectores de expresión pueden además llevar marcadores de selección, tales como el gen de la aminoglucósidotransferasa (APH), el gen de la timidina cinasa (TK), el gen de la xantina-guanina fosforribosiltransferasa de *E. coli* (Ecogpt) y el gen de la dihidrofolato reductasa (dhfr).

Los anticuerpos se pueden recoger, por ejemplo, mediante el cultivo de las células transformadas y a continuación el aislamiento de los anticuerpos desde el interior de las células transformadas o del medio de cultivo. Los anticuerpos se pueden separar y purificar con el uso de una combinación adecuada de métodos, tales como centrifugación,

fraccionamiento con sulfato de amonio, precipitación con sal, ultrafiltración, 1q, FcRn, proteína A, columna de proteína G, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de filtración en gel.

Además, también se describen en la presente memoria métodos para producir un polipéptido que comprende una variante de la región Fc de anticuerpo que tiene realzada la actividad de fijación al FcγRIIb en comparación con un polipéptido que comprende una región Fc original, que comprende la adición de al menos una alteración de aminoácido a la variante de la región Fc.

Los ejemplos incluyen los métodos de producción que comprenden las etapas siguientes:

(a) añadir al menos una alteración aminoacídica a una región Fc de polipéptidos que comprenden la región Fc;

(b) medir la actividad de fijación al FcγRIIb de los polipéptidos alterados en la etapa (a); y

(c) seleccionar los polipéptidos que comprenden una variante de la región Fc que tienen realzada la actividad fijación al FcγRIIb en comparación con un polipéptido que comprende una región Fc original.

Un aspecto preferido es un método para producir un polipéptido que comprende una variante de la región Fc, que comprende las etapas de:

(a) alterar un ácido nucleico que codifica el polipéptido, de tal modo que la actividad de fijación al FcγRIIb está realzada en comparación con el polipéptido que comprende una región Fc original;

(b) introducir el ácido nucleico en las células hospedadoras y cultivarlas para inducir la expresión; y

(c) recoger el polipéptido del cultivo de células hospedadoras.

Además, los anticuerpos y las moléculas de la proteína de fusión con Fc producidos mediante este método de producción también están descritos en la presente memoria.

También se describe en la presente memoria un método para producir un polipéptido que comprende una variante de la región Fc con realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R) cuando se compara con la de un polipéptido que comprende una región Fc original, en donde el método comprende añadir al menos una alteración de aminoácido a una variante de la región Fc de anticuerpo en un polipéptido que comprende la variante de la región Fc.

Un ejemplo es un método de producción que comprende las etapas de:

(a) añadir al menos una alteración aminoacídica a una región Fc en un polipéptido que comprende la región Fc;

(b) determinar la actividad de fijación al FcγRIIa y la actividad de fijación al FcγRIIb que presenta el polipéptido alterado en la etapa (a); y

(c) seleccionar un polipéptido que comprende una variante de la región Fc con realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R) cuando se compara con la de un polipéptido que comprende una región Fc original.

En un aspecto preferido, es un método para producir polipéptidos que comprenden una variante de la región Fc, en donde el método comprende las etapas de:

(a) modificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una región Fc original para conseguir el realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R) cuando se compara con la del polipéptido;

(b) transfectar el ácido nucleico en una célula hospedadora y cultivar la célula para que exprese el ácido nucleico; y

(c) recoger el polipéptido del cultivo de las células hospedadoras.

Los anticuerpos y las moléculas de la proteína de fusión con Fc producidos mediante el método de producción también están descritos en la presente memoria.

Además, también se describe en la presente memoria un método para producir un polipéptido que comprende una variante de la región Fc con realce de la actividad de fijación al FcγRIIb y realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R) cuando se compara con las de un polipéptido que comprende una región Fc original, en donde el método comprende añadir al menos una alteración aminoacídica a una variante de la región Fc de anticuerpo en un polipéptido que comprende la variante de la región Fc de anticuerpo.

Un ejemplo es un método de producción que comprende las etapas de:

(a) añadir al menos una alteración aminoacídica a una región Fc en un polipéptido que comprende la región Fc;

(b) determinar la actividad de fijación al FcγRIIa y la actividad de fijación al FcγRIIb que tiene el polipéptido alterado en la etapa (a); y

(c) seleccionar un polipéptido que comprende una variante de la región Fc con realce de la actividad de fijación al FcγRIIb y realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R) cuando se compara con las de un polipéptido que comprende una región Fc original.

En un aspecto preferido, es un método para producir polipéptidos que comprenden una variante de la región Fc, en donde el método comprende las etapas de:

(a) modificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una región Fc original para conseguir el realce de la actividad de fijación al FcγRIIb y el realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R) cuando se compara con las del polipéptido;

(b) transfectar el ácido nucleico en una célula hospedadora y cultivar la célula para que exprese el ácido nucleico; y

(c) recoger el polipéptido del cultivo de las células hospedadoras.

Los anticuerpos y las moléculas de la proteína de fusión con Fc producidos mediante el método de producción también están descritos en la presente memoria.

También se describen en la presente memoria métodos para producir un polipéptido en los que se suprime la producción de anticuerpos contra el polipéptido en comparación con un polipéptido que comprende una región Fc original cuando se administra *in vivo,* lo que comprende añadir al menos una alteración aminoacídica en la región Fc de un polipéptido que comprende una región Fc de anticuerpo.

Los ejemplos incluyen un método de producción que comprende las etapas siguientes:

(a) añadir al menos una alteración aminoacídica a una región Fc de un polipéptido que comprende una región Fc; y

(b) confirmar que la producción de anticuerpos está suprimida cuando el polipéptido que comprende una región Fc alterada en la etapa (a) se administra *in vivo* en comparación con un polipéptido que comprende una región Fc original.

El que se haya suprimido o no la producción de anticuerpos contra el polipéptido se puede confirmar mediante los métodos en los que se administra el polipéptido a un animal o similar. Como alternativa, la supresión de la producción de anticuerpos se puede determinar con la medición de la actividad de fijación por el FcγRIIa y por el FcγRIIb, y la observación de un incremento del valor obtenido al dividir el valor de KD para el FcγRIIa entre el valor de KD para el FcγRIIb. Tales polipéptidos se considera que son útiles como fármacos ya que pueden suprimir la producción de anticuerpos sin activar el FcγR activador.

En los métodos de producción mencionados más arriba, se prefiere que se realce la actividad de fijación al FcγRIIb y que se realce la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R).

Un ejemplo de un aspecto preferido del método de producción mencionado más arriba es alterar una región Fc de IgG de humano para que se introduzca en la región Fc la alteración del aminoácido de la posición 238 (numeración EU) en otro aminoácido y la alteración de al menos un aminoácido seleccionado de los aminoácidos en las posiciones 233, 234, 235, 237, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 271, 272, 274, 296, 326, 327, 330, 331, 332, 333, 334, 355, 356, 358, 396, 409 y 419 de acuerdo con la numeración EU en otro aminoácido. Otras alteraciones de aminoácidos que se combinan con la alteración del aminoácido de la posición 238 (numeración EU) son preferiblemente las de las posiciones de los aminoácidos 233, 237, 264, 267, 268, 271, 272, 296, 327, 330, 332, 333 y 396 de acuerdo con la numeración EU y, en particular, las de las posiciones de los aminoácidos 233, 237, 264, 267, 268, 271, 296, 330 y 396. En particular, una combinación preferida de alteraciones aminoacídicas en términos de realce de la actividad de fijación al FcγRIIb o de realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa incluye, por ejemplo, la combinación de alteraciones aminoacídicas en las posiciones de los aminoácidos 238, 268 y 271 (numeración EU) con al menos una alteración aminoacídica seleccionada de las posiciones 233, 237, 264, 267, 272, 296, 327, 330, 332 y 396 (numeración EU).

Los aminoácidos a alterar no están particularmente limitados, siempre y cuando se realce la actividad de fijación al FcγRIIb o se realce la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa cuando se comparan antes de la alteración, pero se prefiere que el aminoácido de la posición 238 sea Asp, el aminoácido de la posición 233 sea Asp, el aminoácido de la posición 234 sea Tyr, el aminoácido de la posición 237 sea Asp, el aminoácido de la posición 264 sea Ile, el aminoácido de la posición 265 sea Glu, el aminoácido de la posición 266 sea Phe, Leu o Met, el aminoácido de la posición 267 sea Ala, Glu, Gly o Gln, el aminoácido de la posición 268 sea Asp, Gln o Glu, el aminoácido de la posición 269 sea Asp, el aminoácido de la posición 271 sea Gly, el aminoácido de la posición 272 sea Asp, Phe, Ile, Met, Asn, Pro o Gln, el aminoácido de la posición 274 sea Gln, el aminoácido de la posición 296 sea Asp o Phe, el aminoácido de la posición 326 sea Ala o Asp, el aminoácido de la posición 327 sea Gly, el aminoácido de la posición 330 sea Lys, Arg o Ser, el aminoácido de la posición 331 sea Ser, el aminoácido de la posición 332 sea

Lys, Arg, Ser o Thr, el aminoácido de la posición 333 sea Lys, Arg, Ser o Thr, el aminoácido de la posición 334 sea Arg, Ser o Thr, el aminoácido de la posición 355 sea Ala o Gln, el aminoácido de la posición 356 sea Glu, el aminoácido de la posición 358 sea Met, el aminoácido de la posición 396 sea Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr, el aminoácido de la posición 409 sea Arg, y el aminoácido de la posición 419 sea Glu. Los aminoácidos a alterar son más preferiblemente los que realzan la actividad de fijación al FcγRIIb y también realzan la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa cuando se compara antes de la alteración. En particular, cuando se combinan alteraciones en las posiciones de los aminoácidos 238, 268 y 271 (numeración EU) con al menos una posición de aminoácido seleccionada de 233, 264, 267, 272, 296, 327, 330, 332 y 396 (numeración EU), se prefiere que el aminoácido de la posición 238 sea Asp, el aminoácido de la posición 268 sea Asp o Glu, el aminoácido de la posición 271 sea Gly, el aminoácido de la posición 233 sea Asp, el aminoácido de la posición 237 sea Asp, el aminoácido de la posición 264 sea Ile, el aminoácido de la posición 267 sea Ala o Gly, el aminoácido de la posición 272 sea Asp o Pro, el aminoácido de la posición 296 sea Asp, el aminoácido de la posición 327 sea Gly, el aminoácido de la posición 330 sea Arg, el aminoácido de la posición 332 sea Thr, y el aminoácido de la posición 396 sea Leu o Met, de acuerdo con la numeración EU.

Entre estas combinaciones, se prefiere la introducción de alteraciones que conducen al mayor realce de la actividad de fijación al FcγRIIb o que conducen al mayor realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R). Los ejemplos de tal combinación preferida de alteraciones de tipo sustitución de aminoácido incluyen las siguientes combinaciones de (a) a (x):

(a) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 268, 271, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(b) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 268, 271, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(c) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 268, 271, 296, 330 y 332 (numeración EU) de una región Fc;

(d) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268, 271 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(e) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 267, 268, 271, 296, 330 y 332 (numeración EU) de una región Fc;

(f) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 267, 268, 271, 296, 330 y 332 (numeración EU) de una región Fc;

(g) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 268, 271, 296, 327 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(h) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268 y 271 (numeración EU) de una región Fc;

(i) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268, 271, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(j) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268, 271, 296, 330 y 396 (numeración EU) de una región Fc;

(k) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 264, 267, 268, 271 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(l) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 264, 267, 268, 271, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(m) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 264, 267, 268 y 271 (numeración EU) de una región Fc;

(n) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 264, 267, 268, 271 y 296 (numeración EU) de una región Fc;

(o) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 267, 268, 271, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(p) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268, 271, 330 y 396 (numeración EU) de la región Fc;

(q) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268, 271, 296, 327, 330 y 396 (numeración EU) de una región Fc;

(r) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 237, 264, 267, 268, 271, 272 y 296 (numeración EU) de una región Fc;

(s) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 264, 267, 268, 271, 272 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(t) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 264, 267, 268, 271, 272, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(u) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 264, 267, 268 y 271 (numeración EU) de una región Fc;

(v) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 237, 267, 268, 271, 296 y 330 (numeración EU) de una región Fc;

(w) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 264, 267, 268, 271, 272 y 296 (numeración EU) de una región Fc; y

(x) alteraciones de los aminoácidos en las posiciones 238, 233, 264, 267, 268, 271 y 296 (numeración EU) de una región Fc;

Además, entre estas combinaciones, las siguientes combinaciones de alteraciones de aminoácido de (a) a (x) que vienen a continuación son las combinaciones de aminoácidos más preferidas:

(a) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(b) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp o Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(c) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 332 es Thr, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(d) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Gly o Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(e) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 332 es Thr, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(f) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 332 es Thr, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(g) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 327 es Gly, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(h) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, y el aminoácido de la posición 271 es Gly, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(i) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido

de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(j) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 396 es Met o Leu, de acuerdo con la numeración EU, en la región Fc;

(k) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(l) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(m) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, y el aminoácido de la posición 271 es Gly, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(n) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, y el aminoácido de la posición 296 es Asp, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(o) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 267 es Ala o Gly, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(p) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 396 es Met o Leu, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(q) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 327 es Gly, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 396 es Met, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(r) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 272 es Asp, y el aminoácido de la posición 296 es Asp, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(s) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 272 es Pro, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(t) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 272 es Pro, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(u) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, y el aminoácido de la posición 271 es Gly, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(v) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 267 es Gly, el aminoácido de la posición 268 es Asp, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(w) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 272 es Asp, y el aminoácido de la posición 296 es Asp, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc; y

(x) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, y el aminoácido de la posición 296 es Asp, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc.

También se describe en la presente memoria un método para alterar un polipéptido para producir un polipéptido con realce de la actividad de fijación al FcγRIIb o realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R) cuando se compara con las de un polipéptido que contiene una región Fc original. También se describe en la presente memoria un método para alterar un polipéptido para producir un polipéptido con realce de la actividad de fijación al FcγRIIb y realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R) cuando se compara con la de un polipéptido que contiene una región Fc original.

También se describen en la presente memoria métodos para alterar un polipéptido para la producción de un polipéptido cuya producción de anticuerpos está suprimida en comparación con la de un polipéptido que comprende una región Fc original cuando se administra *in vivo.*

Un ejemplo de un aspecto preferido incluye la combinación de alteraciones aminoacídicas descritas en el método para producir polipéptidos que comprenden variantes de la región Fc con realce de la actividad de fijación al FcγRIIb o realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R). Un ejemplo de un aspecto más preferido incluye la combinación descrita más arriba de alteraciones aminoacídicas descritas en el método para producir polipéptidos que comprenden variantes de la región Fc con realce de la actividad de fijación al FcγRIIb y realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R).

Por otro lado, también se describe en la presente memoria un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una región Fc que tiene al menos una alteración aminoacídica, en donde el polipéptido comprende una variante de la región Fc con realce de la actividad de fijación al FcγRIIb o realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R) cuando se compara con las de un polipéptido que comprende una región Fc original. También se describe en la presente memoria un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una región Fc que tiene al menos una alteración aminoacídica, en donde el polipéptido comprende una variante de la región Fc con realce de la actividad de fijación al FcγRIIb y realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con la actividad de fijación al FcγRIIa (tipo R), cuando se compara con las de un polipéptido que comprende una región Fc original. El ácido nucleico descrito en la presente memoria puede tener cualquier forma, tal como ADN o ARN.

También se describen en la presente memoria vectores que llevan los ácidos nucleicos descritos más arriba que se describen en la presente memoria. El tipo de vector lo pueden seleccionar adecuadamente los expertos en la técnica según las células hospedadoras que vayan a recibir el vector. Los vectores incluyen, por ejemplo, los descritos más arriba.

Por otra parte, también se describen en la presente memoria células hospedadoras transformadas con los vectores descritos más arriba que se describen en la presente memoria. Los expertos en la técnica saben seleccionar las células hospedadoras adecuadas. Las células hospedadoras incluyen, por ejemplo, las descritas más arriba. Los ejemplos específicos incluyen las células hospedadoras que vienen a continuación.

Cuando las células eucariotas se utilizan como células hospedadoras, se pueden utilizar adecuadamente células de animales, células vegetales o células de hongos. Específicamente, las células de animales incluyen, por ejemplo, las células siguientes.

(1) células de mamífero: CHO (línea de células de ovario de hámster chino), COS (línea de células de riñón de mono), mieloma (Sp2/O, NS0 y similares), BHK (línea de células de riñón de cría de hámster), HeLa, Vero, HEK293 (línea de células de riñón embrionario de humano con ADN compartido del adenovirus (Ad) 5), Freestyle293, célula PER.C6 (línea de células retinianas embrionarias de humano transformadas con los genes E1A y E1B del adenovirus de tipo 5 (Ad5)) y similares (*Current Protocols in Protein Science* (mayo de 2001, unidad 5.9, tabla 5.9.1));

(2) células de anfibio: oocitos de *Xenopus* o similares; y

(3) células de insecto: sf9, sf21, Tn5 o similares.

Además, como célula vegetal, se conoce un sistema de expresión de genes de anticuerpos que utiliza las células procedentes del género *Nicotiana,* tal como *Nicotiana tabacum.* Se pueden utilizar adecuadamente células de callos en cultivo para transformar las células vegetales.

Además, se pueden utilizar las siguientes células como células de hongos:

- levaduras: el género *Saccharomyces,* tal como *Saccharomyces cerevisiae,* y el género *Pichia,* tal como *Pichia pastoris*; y

- hongos filamentosos: el género *Aspergillus,* tal como *Aspergillus niger.*

Además, también se describe en la presente memoria un método de realce de la actividad de fijación al FcγRIIb y/o de realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con la actividad de fijación al FcγRIIa (tipo R), cuando se compara con las de un polipéptido que comprende una región Fc original, en donde el método comprende añadir al menos una alteración aminoacídica en la región Fc en un polipéptido que comprende la región Fc.

También se describen en la presente memoria métodos para suprimir la producción de anticuerpos contra un polipéptido que comprende una región Fc, que se compara con un polipéptido que comprende una región Fc original, cuando el polipéptido se administra *in vivo,* en donde el método comprende la adición de al menos una alteración aminoacídica en la región Fc del polipéptido.

Un ejemplo de un aspecto preferido es la combinación de alteraciones aminoacídicas descritas en el método para producir polipéptidos que comprenden variantes de la región Fc con realce de la actividad de fijación al FcγRIIb y/o realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R).

Los polipéptidos producidos por cualquiera de los métodos mencionados más arriba también están descritos en la presente memoria.

También se describen en la presente memoria composiciones farmacéuticas que comprenden el polipéptido que comprende una variante de la región Fc descrita en la presente memoria.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se pueden formular, además del anticuerpo o de las moléculas de la proteína de fusión con Fc descritos más arriba, con vehículos farmacéuticamente aceptables mediante los métodos conocidos. Por ejemplo, las composiciones se pueden utilizar por vía parenteral, cuando los anticuerpos se formulan en una solución o suspensión estéril para inyección con el uso de agua o cualquier otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las composiciones se pueden formular mediante la combinación adecuada de los anticuerpos o de las moléculas de la proteína de fusión con Fc con vehículos o medios farmacéuticamente aceptables, específicamente, agua estéril o solución salina fisiológica, aceites vegetales, emulsionantes, agentes de suspensión, tensioactivos, estabilizantes, aromatizantes, excipientes, vehículos, conservantes, aglutinantes, y similares, mezclándolos en una dosis unitaria y presentación requeridas por las implementaciones farmacéuticas aceptadas de manera general. Los ejemplos específicos de los vehículos incluyen ácido silícico anhidro ligero, lactosa, celulosa cristalina, manitol, almidón, carmelosa de calcio, carmelosa de sodio, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, dietilaminoacetato de polivinilacetal, polivinilpirrolidona, gelatina, triglicéridos de cadena media, aceite de ricino 60 endurecido con polioxietileno, sacarosa, carboximetilcelulosa, almidón de maíz, sal inorgánica, y similares. El contenido del ingrediente activo en tal formulación se ajusta de tal forma que se puede obtener una dosis adecuada dentro del margen requerido.

Las composiciones estériles para la inyección se pueden formular con vehículos tales como agua destilada para inyección, de acuerdo con los protocolos estándares.

Las soluciones acuosas utilizadas para la inyección incluyen, por ejemplo, solución salina fisiológica y soluciones isotónicas, que contienen glucosa u otros adyuvantes, tales como D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro de sodio. Estos se pueden utilizar junto con los solubilizantes idóneos, tales como alcohol, específicamente etanol, polialcoholes tales como propilenglicol y polietilenglicol, y tensioactivos no iónicos tales como Polysorbate 80™ y HCO-50.

Los aceites incluyen aceites de sésamo y aceites de soja, y se pueden combinar con solubilizantes tales como benzoato de bencilo o alcohol bencílico. Se pueden formular también con tamponantes, por ejemplo, tampones de fosfato o tampones de acetato de sodio; analgésicos, por ejemplo, hidrocloruro de procaína; estabilizantes, por ejemplo, alcohol bencílico o fenol; o antioxidantes. Las inyecciones preparadas se distribuyen en alícuotas típicamente en las ampollas adecuadas.

Preferiblemente, la administración se lleva a cabo por vía parenteral e incluye específicamente la inyección, la administración intranasal, la administración intrapulmonar y la administración percutánea. Por ejemplo, las inyecciones se pueden administrar de manera sistémica o local mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal o inyección subcutánea.

Además, el método de administración se puede seleccionar adecuadamente de acuerdo con la edad y los síntomas del paciente. Se puede seleccionar una sola dosis de la composición farmacéutica que contiene un anticuerpo o un

polinucleótido que codifica un anticuerpo, por ejemplo, del margen de 0.0001 mg a 1000 mg por kilogramo de masa corporal. Como alternativa, la dosis puede estar, por ejemplo, en el margen de 0.001 a 100 000 mg/paciente. No obstante, la dosis no está limitada a estos valores. La dosis y el método de administración varían según la masa corporal, edad y síntomas del paciente, y los expertos en la técnica la pueden seleccionar adecuadamente.

Los polipéptidos mencionados más arriba que comprenden una variante de la región Fc descrita en la presente memoria son útiles como ingredientes activos de agentes farmacéuticos que suprimen la activación de linfocitos B, mastocitos, células dendríticas y/o basófilos. Los polipéptidos que comprenden una variante de la región Fc descrita en la presente memoria pueden suprimir la activación de linfocitos B, mastocitos, células dendríticas y/o basófilos, mediante la acción selectiva sobre el FcγRIIb sin activar el FcγR activador. La activación de los linfocitos B incluye proliferación, producción de IgE, producción de IgM y producción de IgA. Los polipéptidos mencionados más arriba que comprenden una variante de la región Fc descrita en la presente memoria interconectan el FcγRIIb con la IgE para suprimir la producción de IgE desde los linfocitos B, con IgM para suprimir la producción de IgM desde los linfocitos B, y con IgA para suprimir la producción de IgA. Diferentes a los de más arriba, los efectos supresores similares a los mencionados más arriba se muestran directa o indirectamente cuando se interconecta el FcγRIIb con moléculas que se expresan en los linfocitos B y que comprenden el dominio ITAM dentro de la célula o interaccionan con el dominio ITAM, tales como BCR, CD19 y CD79b. Además, la activación de los mastocitos incluye proliferación, activación por IgE y similares, y la desgranulación. En los mastocitos, los polipéptidos mencionados más arriba que comprenden una variante de la región Fc descrita en la presente memoria pueden suprimir la proliferación, la activación por IgE y similares, y la desgranulación mediante la interconexión directa o indirecta del FcγRIIb con moléculas del receptor de IgE que se expresan sobre los mastocitos y que comprenden el dominio ITAM o interaccionan con el dominio ITAM, tales como FcεRI, DAP12 y CD200R3. La activación de los basófilos incluye la proliferación y desgranulación de los basófilos. También en los basófilos, los polipéptidos mencionados más arriba que comprenden una variante de la región Fc descrita en la presente memoria pueden suprimir la proliferación, activación y desgranulación mediante la interconexión directa o indirecta del FcγRIIb con moléculas de la superficie de la membrana celular, que comprenden el dominio ITAM dentro de la célula o que interaccionan con el dominio ITAM. La activación de las células dendríticas incluye la proliferación y desgranulación de las células dendríticas. También en las células dendríticas, los polipéptidos mencionados más arriba que comprenden una variante de la región Fc descrita en la presente memoria pueden suprimir la activación, desgranulación y proliferación mediante la interconexión directa o indirecta del FcγRIIb con moléculas de la superficie de la membrana celular, que comprenden el dominio ITAM dentro de la célula o que interaccionan con el dominio ITAM.

En la presente descripción, los polipéptidos que comprenden una variante de la región Fc mencionada más arriba son útiles como ingrediente activo de agentes terapéuticos o como agentes preventivos contra las enfermedades inflamatorias inmunitarias. Tal y como está descrito más arriba, ya que los polipéptidos que comprenden una variante de la región Fc descrita en la presente memoria pueden suprimir la activación de linfocitos B, mastocitos, células dendríticas y/o basófilos, la administración de los polipéptidos que comprenden una variante de la región Fc descrita de resultas de la presente memoria pueden tratar o prevenir las enfermedades inflamatorias inmunitarias. Sin pretender limitarse a ellos, el término «enfermedades inflamatorias inmunitarias» comprende artritis reumatoide, hepatitis autoinmunitaria, tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad ampollosa autoinmunitaria, enfermedad suprarrenal autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica autoinmunitaria, anemia megalocítica, gastritis atrófica autoinmunitaria, neutrocitopenia autoinmunitaria, orquitis autoinmunitaria, encefalomielitis autoinmunitaria, enfermedad del receptor autoinmunitaria, infertilidad autoinmunitaria, hepatitis activa crónica, glomerulonefritis, fibrosis pulmonar intersticial, esclerosis múltiple, enfermedad de Paget, osteoporosis, mieloma múltiple, uveítis, espondilitis acuda y crónica, artritis gotosa, enteropatías inflamatorias, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), psoriasis, enfermedad de Crohn, enfermedad de Graves-Basedow, diabetes juvenil, enfermedad de Addison, miastenia grave, uveítis inducida por el cristalino, lupus eritematoso sistémico, rinitis alérgica, dermatitis alérgica, colitis ulcerosa, hipersensibilidad, degeneración muscular, caquexia, esclerodermia sistémica, esclerodermia localizada, síndrome de Sjogren, enfermedad de Behçet, síndrome de Reiter, diabetes de tipo I y tipo II, trastorno osteoclásico, reacción de injerto contra huésped, lesión por revascularización tras una isquemia, aterosclerosis, traumatismo cerebral, paludismo cerebral, septicemia, choque septicémico, síndrome del choque tóxico, fiebre, mialgias debido a colorante, anemia aplásica, anemia hemolítica, trombocitopenia idiopática, síndrome de Goodpasture, síndrome de Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, pénfigo, nefropatía de IgA, polinosis, síndrome del anticuerpo antifosfolipídico, polimiositis, granulomatosis de Wegener, arteritis nudosa, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, fibromialgia, asma, dermatitis atópica, gastritis atrófica crónica, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, pancreatitis autoinmunitaria, síndrome de aortitis, glomerulonefritis de progresión rápida, anemia megaloblástica, púrpura trombocitopénica idiopática, hipotiroidismo primario, enfermedad de Addison primaria, diabetes mellitus insulinodependiente, lupus eritematoso discoidal crónico, pénfigo, herpes gestacional, dermatosis ampollosa lineal de IgA, epidermólisis ampollosa adquirida, alopecia areata, vitíligo vulgar, vitíligo centrífugo de Sutton, enfermedad de Harada, neuropatía óptica autoinmunitaria, azoospermia idiopática, aborto habitual, hipoglucemia, urticaria crónica, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, artritis enteropática, artritis reactiva, espondiloartropatía, entesopatía, síndrome del colon irritable, síndrome de fatiga crónica, dermatomiositis, miositis con cuerpos de inclusión, síndrome de Schmidt, enfermedad de Graves, anemia perniciosa, hepatitis lupoide, demencia presenil, enfermedad de Alzheimer, trastorno desmielinizante, esclerosis lateral amiotrófica, hipoparatiroidismo, síndrome de Dressler, síndrome de Eaton-Lambert, dermatitis herpetiforme, alopecia, esclerosis sistémica progresiva, síndrome CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, disfunción esofágica, esclerodactilia y telangiectasias), sarcoidosis, fiebre

reumática, eritema multiforme, síndrome de Cushing, reacción por transfusión, enfermedad de Hansen, arteritis de Takayasu, polimialgia reumática, arteritis temporal, artritis de células gigantes, eczema, granulomatosis linfomatoide, enfermedad de Kawasaki, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, endoftalmitis, eritroblastosis fetal, fascitis eosinófila, síndrome de Felty, púrpura de Henoch-Schonlein, rechazo de trasplante, parotiditis, cardiomiopatía, artritis purulenta, fiebre mediterránea familiar, síndrome de Muckle-Wells, y síndrome de hiper-IgD.

Además, las enfermedades autoinmunitarias que pueden estar causadas por la producción de anticuerpos contra autoantígenos (autoanticuerpos), los polipéptidos que comprenden una variante de la región Fc mencionada más arriba son útiles como ingrediente activo de medicamentos para el tratamiento o la prevención las enfermedades autoinmunitarias mediante la supresión de la producción de los autoanticuerpos. Se ha descrito que el uso de una molécula producida por la fusión de una porción Fc de anticuerpo con AchR (un autoantígeno de la miastenia grave) suprime la proliferación de los linfocitos B que expresan el BCR que reconoce el AchR e induce la apoptosis (*J. Neuroimmunol*, 227: 35-43, 2010). El uso de una proteína de fusión formada entre un antígeno reconocido por un autoanticuerpo y una región Fc de anticuerpo descrita en la presente memoria permite interconectar el FcγRIIb con el BCR de un linfocito B que expresa el BCR para dicho autoantígeno, la supresión de la proliferación de los linfocitos B que expresan el BCR para el autoantígeno, y la inducción de la apoptosis. Tales enfermedades autoinmunitarias incluyen síndrome de Guillain-Barré, miastenia grave, gastritis atrófica crónica, hepatitis autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, pancreatitis autoinmunitaria, síndrome de aortitis, síndrome de Goodpasture, glomerulonefritis de progresión rápida, anemia megaloblásica, anemia hemolítica autoinmunitaria, neutrocitopenia autoinmunitaria, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Graves-Basedow, tiroiditis de Hashimoto, hipotiroidismo primario, enfermedad de Addison idiopática, diabetes mellitus insulinodependiente , lupus eritematoso discoide crónico, esclerodermia localizada, pénfigo, penfigoide, herpes gestacional, dermatosis ampollosa de IgA lineal, epidermólisis ampollosa adquirida, alopecia areata, vitíligo vulgar, vitíligo centrífugo de Sutton, enfermedad de Harada, neuropatía óptica autoinmunitaria, azooespermia idiopática, aborto común, diabetes de tipo II, hipoglucemia y urticaria crónica; pero no se limitan a ellas.

Además, los polipéptidos mencionados más arriba que comprenden una variante de la región Fc descritos en la presente memoria son útiles como ingrediente activo en los agentes terapéuticos para las enfermedades con deficiencia de una proteína esencial desde el punto de vista biológico. Para las enfermedades con deficiencia de una proteína esencial desde el punto de vista biológico, se utilizan métodos terapéuticos que administran y suplementan la proteína como medicamento. Sin embargo, ya que el paciente carece de la proteína desde el comienzo, la proteína suplementada desde el exterior se reconoce como una sustancia extraña y se producen los anticuerpos contra dicha proteína. Como resultado, la proteína se retira con facilidad y se reduce el efecto como medicamento. El uso de una proteína de fusión que comprende tal proteína y una región Fc de anticuerpo descrita en la presente memoria permite interconectar el FcγRIIb y el BCR en los linfocitos B que reconocen la proteína y permite la supresión de la producción del anticuerpo contra la proteína. Las proteínas a suplementar incluyen Factor VIII, Factor IX, TPO, EPO, α-iduronidasa, iduronato sulfatasa, *N*-sulfatasa de heparano de tipo A, α-*N*-acetilglucosaminidasa de tipo B, acetil-CoA de tipo C: α-glucosaminidasa acetiltransferasa, *N*-acetilglucosamina 6-sulfatasa de tipo D, galactosa 6-sulfatasa, *N*-acetilgalactosamina 4-sulfatasa, β-glucuronidasa, α-galactosidasa, α-galactosidasa ácida y glucocerebrosidasa. Estas proteínas se pueden suplementar para enfermedades tales como hemofilia, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia renal y enfermedad lisosómica (mucopolisacaridosis, enfermedad de Fabry, enfermedad de Pompe y enfermedad de Gaucher) sin estar limitadas a ellas.

Además, los polipéptidos mencionados más arriba que comprenden una variante de la región Fc descrita en la presente memoria son útiles como ingrediente activo para antivíricos. Los anticuerpos que comprenden una región Fc descrita en la presente memoria y que son anticuerpos antivíricos pueden suprimir la potenciación dependiente de anticuerpos que se observa con los anticuerpos antivíricos. La potenciación dependiente de anticuerpos es un fenómeno en el que un virus utiliza los anticuerpos neutralizantes contra el virus para que pueda ser fagocitado por los FcγR activadores e infecta las células que expresan el FcγR para que se extienda la infección. Se ha descrito que la fijación de los anticuerpos neutralizantes contra el virus del dengue al FcγRIIb desempeña una función importante a la hora de suprimir la potenciación dependiente de anticuerpos (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108: 12479-12484, 2011). La interconexión del FcγRIIb con un complejo inmunitario contra el virus del dengue, que está formado por anticuerpos neutralizantes contra el virus del dengue, inhibe la fagocitosis mediada por el FcγR, lo que da lugar a la supresión de la potenciación dependiente de anticuerpos. Los ejemplos de tales virus incluyen el virus del dengue (DENV1, DENV2 y DENV4) y el VIH, pero no se limitan a ellos.

Además, los polipéptidos que comprenden una variante de la región Fc descritos más arriba son útiles como ingrediente activo en los agentes preventivos o en los agentes terapéuticos contra la arterioesclerosis. Los anticuerpos contra las LDL oxidadas, esto es, una causa de la arterioesclerosis, que son anticuerpos que comprenden una región Fc descrita en la presente memoria, pueden impedir la adherencia de las células inflamatorias dependiente del FcγRIIa. Se ha descrito que, aunque los anticuerpos anti-LDL oxidadada inhiben la interacción entre la LDL oxidada y el CD36, los anticuerpos contra la LDL oxidada se fijan a las células endoteliales, y los monocitos reconocen su porción Fc de una manera dependiente del FcγRIIa o de una manera dependiente del FcγRI; y esto conduce a la adherencia (*Immunol. Lett*., 108: 52-61, 2007). El uso de anticuerpos que comprenden una región Fc descrita en la presente memoria para tales anticuerpos puede inhibir la fijación dependiente del FcγRIIa y suprimir la adherencia de los monocitos mediante señales inhibidoras dependientes del FcγRIIb.

En la presente descripción, los polipéptidos que comprenden una variante de la región Fc descrita más arriba son útiles como ingrediente activo en los agentes terapéuticos o en los agentes preventivos contra el cáncer. Tal y como se describe más arriba, se sabe que el realce de la fijación al FcγRIIb realza la actividad agonista de un anticuerpo agonista y realza el efecto antitumoral del anticuerpo. Por lo tanto, los anticuerpos agonistas que utilizan la variante de la región Fc descrita en la presente memoria son útiles para el tratamiento o la prevención del cáncer. Específicamente, la variante de la región Fc descrita en la presente memoria realza la actividad agonista de anticuerpos agonistas contra, por ejemplo, los receptores de la familia del receptor del TNF, tales como aliasas, CD120a, CD120b, receptor de la linfotoxina β, CD134, CD40, FAS, TNFRSF6B, CD27, CD30, CD137, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D, RANK, osteoprotegerina, TNFRSF12A, TNFRSF13B, TNFRSF13C, TNFRSF14, receptor del factor del crecimiento nervioso, TNFRSF17, TNFRSF18, TNFRSF19, TNFRSF21, TNFRSF25 y receptor de la ectodisplasina A2, y se pueden utilizar para el tratamiento o la prevención del cáncer. Así mismo, además de lo anterior, la actividad agonista también mejora para anticuerpos agonistas contra las moléculas que necesitan interaccionar con el FcγRIIb para mostrar su actividad agonista. Además, al incorporar la variante de la región Fc descrita en la presente memoria en un polipéptido que tiene actividad de fijación a una molécula, tal como Kit, un tipo de receptor con actividad tirosina cinasa (RTK, por su nombre en inglés), que suprime la proliferación celular tras la interconexión con el FcγRIIb, se puede realzar el efecto inhibidor contra las células que expresan tal molécula. Sin limitarse a ellos, el cáncer incluye cáncer de pulmón (que incluye el cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma pulmonar, y carcinoma epidermoide del pulmón), cáncer de intestino grueso, cáncer de recto, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de tiroides, colangiocarcinoma, cáncer de peritoneo, mesotelioma, carcinoma de las células escamosas, cáncer de cuello uterino, cáncer de endometrio, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer nasofaríngeo, tumor de las glándulas salivales, timoma, cáncer de piel, tumor de células basales, melanoma maligno, cáncer de ano, cáncer de pene, cáncer de testículos, tumor de Wilms, leucemia mieloide aguda (que incluye mieloleucemia aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda y leucemia monocítica aguda), leucemia mielógena crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfática crónica, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin (linfoma de Burkitt, leucemia linfocítica crónica, micosis fungoide, linfoma de las células del manto, linfoma folicular, linfoma difuso de las células grandes, linfoma de la zona marginal, plasmacitoma de la leucemia pilocítica, linfoma de linfocitos T periféricos y leucemia/linfoma de linfocitos T del adulto), histiocitosis de las células de Langerhans, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico, tumor de cerebro (que incluye glioma, astroglioma, glioblastoma, meningioma y ependimoma), neuroblastoma, retinoblastoma, osteosarcoma, sarcoma de Kaposi, sarcoma de Ewing, angiosarcoma y hemangiopericitoma.

Además, también se describen en la presente memoria métodos para el tratamiento o la prevención de enfermedades inflamatorias inmunitarias, que comprenden la etapa de administrar a un sujeto (paciente) un polipéptido que comprende una variante de la región Fc descrita en la presente memoria o un polipéptido que comprende una variante de la región Fc producida por los métodos de producción descritos en la presente memoria.

También se describen en la presente memoria kits para ser usados en los métodos terapéuticos o en los métodos preventivos descritos en la presente memoria, que comprenden al menos un polipéptido que comprende una variante de la región Fc descrita en la presente memoria o un polipéptido que comprende una variante de la región Fc producida mediante los métodos de producción descritos en la presente memoria, o una composición farmacéutica descrita en la presente memoria. Además, se pueden incluir en el kit vehículos farmacéuticamente aceptables, medios, instrucciones sobre el uso del método y similares. Así mismo, también se describe en la presente memoria el uso de un polipéptido que comprende una variante de la región Fc descrita en la presente memoria o un polipéptido que comprende una variante de la región Fc producida por los métodos de producción descritos en la presente memoria en la producción de agentes para el tratamiento o la prevención de las enfermedades inflamatorias inmunitarias. También se describen en la presente memoria polipéptidos que comprenden una variante de la región Fc descrita en la presente memoria o polipéptidos que comprenden una variante de la región Fc producida por los métodos de producción descritos en la presente memoria para ser usada en los métodos terapéuticos o en los métodos preventivos descritos en la presente memoria.

Tal y como se emplea en esta memoria, los códigos de tres letras y de una sola letra para los correspondientes aminoácidos se describen a continuación:

Alanina: Ala (A)

Arginina: Arg (R)

Asparagina: Asn (N)

Ácido aspártico: Asp (D)

Cisteína: Cys (C)

Glutamina: Gln (Q)

Ácido glutámico: Glu (E)

Glicina: Gly (G)

Histidina: His (H)

Isoleucina: Ile (I)

Leucina: Leu (L)

Lisina: Lys (K)

Metionina: Met (M)

Fenilalanina: Phe (F)

Prolina: Pro (P)

Serina: Ser (S)

Treonina: Thr (T)

Triptófano: Trp (W)

Tirosina: Tyr (Y)

Valina: Val (V)

Ejemplos

A partir de este momento de la presente memoria, la presente invención se describirá específicamente además con referencia a los ejemplos, pero no se debe considerar que se limita a ellos.

[Ejemplo 1] Valoración de la capacidad de agregación plaquetaria que presentan los anticuerpos existentes que comprenden una Fc con realce de la fijación al FcγRIIb

Tal y como se muestra en la tabla 16 en el ejemplo 4 de referencia, una técnica existente de realce por el FcγRIIb que introduce alteraciones que implican la sustitución del Glu por Ser en la posición 267 y la sustitución de la Phe por Leu en la posición 328 (numeración EU) en la IgG1 de humano nativa (documento 28 que no es patente) muestra unn realce de la fijación al FcγRIIb de 408 veces y una disminución de 0.51 veces al FcγRIIaH, mientras que muestra un realce de la fijación al FcγRIIaR de 522 veces en comparación con las de la IgG1. Tal y como se describe en «Antecedentes de la técnica», incluso aunque se realce la fijación al FcγRIIb, cuando se trata de células tales como las plaquetas que solo expresan el FcγRIIa, solo pueden estar afectados los efectos de realce sobre el FcγRIIa. Es decir, las técnicas existentes que realzan la fijación al FcγRIIaR tienen el peligro de realzar la actividad de agregación de las plaquetas y de incrementar el riesgo de desarrollar una trombosis. Para confirmar esto, se valoró si la actividad de agregación plaquetaria se realza realmente cuando se realza la fijación de un anticuerpo al FcγRIIa.

Mediante el uso del método del ejemplo 1 de referencia, se produjo el omalizumab_VH-G1d (SEQ ID n.º 25) como la cadena pesada y se produjo el omalizumab_VL-CK (SEQ ID n.º 26) como la cadena ligera de un anticuerpo de tipo IgG1 de humano que se fija a la IgE. Así mismo, para realzar la actividad de fijación al FcγRIIb de humano que tenía el omalizumab_VH-G1d, se produjo el omalizumab_VH-G1d-v3 por sustitución del Glu por Ser en la posición 267 y de la Phe por Leu en la posición 328 de acuerdo con la numeración EU en el omalizumab_VH-G1d. Mediante el uso del método del ejemplo 1 de referencia, se produjo omalizumab-Gld-v3 que contenía omalizumab_VH-G1d-v3 como cadena pesada y omalizumab_VL-CK como cadena ligera. Se valoró la capacidad de agregación de las plaquetas con este anticuerpo.

Se valoró la agregación plaquetaria mediante el uso del agregómetro de plaquetas HEMA TRACER 712 (LMS Co.). Primero se recogieron aproximadamente 50 ml de sangre completa en una cantidad fija de tubos de recogida de sangre evacuada de 4.5 ml que contenían 0.5 ml de citrato de sodio al 3.8%, y esto se centrifugó a 200*g* durante 15 min. Se recogió el sobrenadante resultante y se utilizó como plasma rico en plaquetas (PRP). Después de lavar el PRP con el tampón 1 (NaCl a 137 mM, KCl a 2.7 mM, $NaHCO_3$ a 12 mM, NaH_2PO a 0,42 mM, $MgCl_2$ a 2 mM, HEPES a 5 mM, dextrosa a 5.55 mM, 1.5 U/ml de apirasa, SAB al 0.35 %), se remplazó el tampón por el tampón 2 (NaCl a 137 mM, KCl a 2.7 mM, $NaHCO_3$ a 12 mM, NaH_2PO_4 a 0.42 mM, $MgCl_2$ a 2 mM, HEPES a 5 mM, dextrosa a 5.55 mM, $CaCl_2$ a 2 mM, SAB al 0.35 %) para preparar aproximadamente 300 000 plaquetas lavadas por microlitro. Las plaquetas lavadas se distribuyeron en alícuotas de 156 µl en cubetas de ensayo que contenían un conjunto de barras de agitación en el agregómetro de plaquetas. Las plaquetas se agitaron a 1000 rpm con la barra de agitación en las cubetas mantenidas a 37.0 °C en el agregómetro de plaquetas. Se añadieron a las cubetas 44 µl del complejo inmunitario de omalizumab-G1d-v3 e IgE a una relación molar de 1:1 (preparados a concentraciones finales de 600 µg/ml y 686 µg/ml, respectivamente). Las plaquetas se hicieron reaccionar con el complejo inmunitario durante 5 min. A continuación, a una concentración que no permite la agregación secundaria de las plaquetas, se le añadió difosfato de adenosina (ADP, SIGMA) a la mezcla de reacción para analizar si se realza la agregación.

En las figuras 1 y 2 se muestra el resultado de cada donante con una forma polimórfica de FcγRIIa (H/H o R/H) obtenida del ensayo de más arriba. A partir del resultado de la figura 1, se demuestra que mejora la agregación de las plaquetas con la forma polimórfica de FcγRIIa (R/H) cuando se añade el complejo inmunitario. Mientras tanto, tal y como se muestra en la figura 2, la agregación de las plaquetas no se realza con la forma polimórfica de FcγRIIa (H/H).

A continuación, se valoró la activación de las plaquetas con marcadores de activación. La activación de las plaquetas se puede medir basándose en el incremento de expresión de un marcador de activación tal como CD62p (p-selectina) o la integrina activa sobre la superficie de la membrana de las plaquetas. Se le añadieron 2.3 µl del complejo inmunitario a 7.7 µl de las plaquetas lavadas preparadas mediante el método descrito más arriba. Después de 5 min de reacción a temperatura ambiente, se indujo la activación con la adición de ADP a una concentración final de 30 µM y se valoró si el complejo inmunitario realza la activación dependiente de ADP. Como control negativo se utilizó una muestra a la que se añadió el tampón de fosfato (pH 7.4; Gibco) en vez del complejo inmunitario. Se realizó la tinción con la adición, a cada muestra después de la reacción, del anticuerpo anti-CD62 marcado con PE (BECTON DICKINSON), el anticuerpo anti-CD61 marcado con PerCP y el anticuerpo PAC-1 marcado con FITC (BD Bioscience). Se midió cada una de las intensidades de fluorescencia en un citómetro de flujo (FACS CantoII, BD Bioscience).

El resultado sobre la expresión de CD62p, obtenida mediante el método de ensayo de más arriba, se muestra en la figura 3. El resultado sobre la expresión de la integrina activada se muestra en la figura 4. Las plaquetas lavadas que se utilizaron se obtuvieron de una persona sana con la forma polimórfica del FcγRIIa R/H. Tanto CD62p como la integrina activa expresados en la superficie de la membrana de las plaquetas, que está inducida por la estimulación con ADP, se realzaron en presencia del complejo inmunitario.

A partir de estos resultados, en los anticuerpos existentes que tienen una Fc con realce de la fijación al FcγRIIb de humano, que tienen una Fc producida por la introducción de la sustitución de la Ser de la posición 267 por Glu y de la Leu de la posición 328 por Phe (numeración EU) en una Fc de la IgG1, los polimorfismos genéticos del FcγRIIa cuyo aminoácido en la posición 131 es R mostraron realzada la actividad de agregación plaquetaria en comparación con cuando el aminoácido en la posición 131 es H. Es decir, se sugirió que los anticuerpos existentes que tienen una Fc con realce de la fijación al FcγRIIb de humano corren el peligro de incrementar el riesgo de desarrollar una trombosis debido a la agregación plaquetaria en los humanos portadores del FcγRIIa de tipo R, lo que pone de manifiesto el valor de una Fc que soluciona este problema mediante el realce de su fijación selectiva por el FcγRIIb.

[Ejemplo 2] Producción de variantes con realce de la fijación al FcγRIIb

Tal y como se muestra en el ejemplo 1, cuando se realza la fijación al FcγRIIb es necesario realzar la fijación al FcγRIIb mientras que también se suprime todo lo posible la fijación a otros FcγR activadores. Por lo tanto, se evaluó la producción de variantes con realce de la fijación al FcγRIIb o de la selectividad por el FcγRIIb mediante la combinación de alteraciones que tienen el efecto de realzar la fijación o realzar la selectividad con respecto al FcγRIIb. Específicamente, al utilizar como base la alteración P238D, que muestra excelentes efectos tanto en el realce de la fijación como en el realce de la selectividad con respecto al FcγRIIb, se combinaron además las alteraciones que se halló que eran eficaces tras la combinación con la P238D en los ejemplos 6, 8 y 9 de referencia.

La región variable del IL6R-H (SEQ ID n.º 18) que se describe en la solicitud de patente internacional WO 2009/125825 y que es la región variable de un anticuerpo contra el receptor de la interleucina 6 de humano se produjo como la región variable de la cadena H del anticuerpo, y el IL6R-G1d (SEQ ID n.º 19) que tiene G1d producido por la retirada de las Gly y Lys del extremo carboxilo de la IgG1 de humano se produjo como la región constante de la cadena H del anticuerpo. Además, el IL6R-B3 (SEQ ID n.º 23) se produjo mediante la introducción de K439E en el IL6R-G1d. A continuación, se produjeron variantes de IL6R-B3 por combinación con E233D, L234Y, G237D, S267Q, H268D, P271G, Y296D, K326D, K326A, A330R, A330K, que son alteraciones que se ha hallado que son eficaces tras la combinación con P238D en los ejemplos de referencia 6, 8 y 9. El IL6R-L (SEQ ID n.º 21) se utilizó como la cadena L común del anticuerpo. Estas variantes se utilizaron para la expresión y purificación de los anticuerpos de acuerdo con el método del ejemplo de referencia 1 y se valoró la fijación a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIa de tipo H, FcγRIIa de tipo R, FcγRIIb y FcγRIIIa de tipo V) mediante el método del ejemplo 2 de referencia.

Los valores de KD de cada variante para cada FcγR se muestran en la tabla 1. «Alteración» en la tabla hace referencia a las alteraciones introducidas en el IL6R-B3 (SEQ ID n.º 23). Mientras tanto, el IL6R-B3/IL6R-L que se utiliza como molde para producir cada una de las variantes se indica con un asterisco (*). «KD(IIaR)/KD(IIb)» en la tabla muestra el valor obtenido al dividir la KD de cada variante para el FcγRIIaR entre la KD de cada variante para el FcγRIIb. Cuanto mayor es este valor, mayor es la selectividad por el FcγRIIb. «KD(IIb) del polipéptido original/KD(IIb) del polipéptido alterado» se refiere a un valor obtenido al dividir el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para el FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para el FcγRIIb. Por otra parte, «KD(IIaR) del polipéptido original/KD(IIaR) del polipéptido alterado» se refiere a un valor obtenido al dividir el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para el FcγRIIaR entre el valor de KD de cada variante para el FcγRIIaR. En la tabla 1, las celdas con relleno de gris muestran los valores calculados mediante la ecuación siguiente

[Ecuación 2]

$$KD = C \bullet R_{máx}/(R_{eq} - RI) - C$$

descrita en el ejemplo 2 de referencia ya que la fijación del FcγR a la IgG se determinó que era demasiado débil para analizarla con exactitud mediante el análisis cinético.

[Tabla 1]

NOMBRE DE LA VARIANTE	ALTERACIÓN	KD PARA FcγRIa (mol/l)	KD PARA FcγRIIaR (mol/l)	KD PARA FcγRIIaH (mol/l)	KD PARA FcγRIIb (mol/l)	KD PARA FcγRIIIaV (mol/l)	KD(IIaR)/KD(IIb)	KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO	KD(IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/KD(IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO
IL6R-G1d/IL6R-L		3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	1.2	1.1
IL6R-B3/IL6R-L	*	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	1.0	1.0
IL6R-BF648/IL6R-L	P238D	1.1E-08	1.5E-05	4.0E-05	1.2E-06	7.1E-05	12.5	2.6	0.1
IL6R-BP215/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	4.3E-08	1.3E-06	1.4E-05	4.1E-08	5.7E-05	31.7	75.6	0.8
IL6R-BP216/IL6R-L	G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/A330K	6.2E-07	2.9E-06	2.6E-05	1.4E-07	5.3E-05	20.7	22.1	0.4
IL6R-BP217/IL6R-L	G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330K	2.8E-06	3.6E-06	2.8E-05	1.5E-07	6.0E-05	24.0	20.7	0.3
IL6R-BP218/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330K	3.7E-08	1.5E-08	1.2E-05	7.6E-08	3 8E-05	19.7	40.8	0.7
IL6R-BP219/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	4.6E-08	6.1E-07	2.5E-06	3.4E-08	2.9E-05	17.9	91.2	1.8
IL6R-BP220/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	2.0E-08	1.1E-08	1.2E-05	3.6E-08	5.8E-05	30.6	86.1	1.0
IL6R-BP221/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330R	1.3E-07	7.1E-07	2.5E-06	2.8E-08	4.6E-05	25.4	110.7	1.5
IL6R-BP222/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330R	5.1E-08	7.1E-07	2.6E-06	3.4E-08	4.7E-05	20,9	91.2	1.5
IL6R-BP223/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R	2.7E-08	6.0E-07	2.8E-06	2.5E-08	3.2E-05	24.0	124.0	1.8
IL6R-BP224/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/S267G/H268D/P271G/K326A/A330R	6.2E-09	4.5E-07	9.5E-06	3.5E-08	4.1E-05	12.9	88.6	2.4
IL6R-BP225/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326D/A330R	9.5E-08	6.9E-07	2.8E-06	3.5E-08	3.2E-05	19.7	88.6	1.6
IL6R-BP226/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330R	5.2E-08	5.7E-07	2.4E-06	3.3E-08	3.6E-05	17.3	93.9	1.9
IL6R-BP227/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330R	2-7E-08	6.2E-07	2.9E-06	3.2E-08	2.6E-05	19.4	96.9	1.8
IL6R-BP228/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/K326D/A330R	5.5E-09	4.2E-07	1.1E-05	4.0E-08	3.2E-05	10.5	77.5	2.6
IL6R-BP229/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330R	5.6E-08	8.1E-07	3.3E-06	4.2E-08	3.7E-05	19.3	73.8	1.4
IL6R-BP230/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	1.4E-08	5.7E-07	9.6E-06	2.1E-08	6.7E-05	27.1	147.6	1.9
IL6R-BP231/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	9.4E-09	7.4E-07	1.1E-05	2.3E-08	4.0E-05	32.2	134.8	1.5
IL6R-BP232/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	7.6E-08	8.4E-07	3.3E-06	5.6E-08	4.5E-05	15.0	55.4	1,3
IL6R-BP233/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/P271G/A330K	7.0E-08	6.9E-07	2.8E-06	3.7E-08	5.1E-05	18.6	83.8	1.6
IL6R-BP234/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330K	6.5E-09	1.2E-05	2.0E-05	1.2E-07	3.1E-05	10.0	25.8	0.8
IL6R-BP235/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R	3.5E-00	6.8E-07	7.5E-06	4.4E-08	2.6E-05	15.5	70.5	1.6
IL6R-BP236/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R	7.7E-09	8.4E-07	1.9E-05	6.5E-08	3.9E-05	12.9	47.7	1.3
IL6R-BP237/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330K	4.1E-09	1.1E-06	1.9E-05	1.0E-07	3.5E-05	11.0	31.0	1.0
IL6R-BP238/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R	2.4E-09	6.4E-07	7.0E-06	3.6E-08	2.7E-05	17.8	86.1	1.7
IL6R-BP239/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R	7.6E-09	8.1E-07	1.7E-05	6.0E-08	4.8E-05	13.5	51.7	1.4
IL6R-BP240/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271Q/A330R	7.6E-09	1.5E-06	2.6E-05	9.5E-08	3.2E-05	15.8	32.6	0.7
IL6R-BP241/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330R	1.1E-09	6.8E-07	9.0E-06	4.5E-08	3.1E-05	15.1	68.9	1.6
IL6R-BP242/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R	1.9E-09	7.5E-07	3.6E-06	5.1E-08	2.9E-05	14.7	60.8	1.5
IL6R-BP243/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R	3.0E-09	5.4E-07	6.0E-0	3.6E-08	2.5E-05	15.0	86.1	2.0
IL6R-BP244/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330R	7.8E-09	1.8E-06	2.6E-05	1.1E-07	4.6E-05	16.4	28.2	0.6
IL6R-BP245/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R	6.3E-09	1.4E-06	2.5E-05	8.3E-08	3.9E-05	16.9	37.3	0.8
IL6R-BP246/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R	8.0E-09	1.6E-06	2.3E-05	9.2E-08	4.4E-05	17.4	33.7	0.7
IL6R-BP247/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R	7.5E-09	8.1E-07	1.2E-05	3.7E-08	4.4E-05	21.9	83.8	1.4
IL6R-BP248/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R	1.7E-09	8.2E-07	1.1E-05	3.5E-08	4.4E-05	23.4	88.6	1.3
IL6R-BP249/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	7.0E-09	6.2E-07	7.2E-06	3.7E-08	2.8E-05	16.8	83.8	1.8

La fijación del IL6R-G1d/IL6R-L que lleva la secuencia nativa de IgG1 de humano era de 1.3 veces para el FcγRIa, 1.1 veces para el FcγRIIaR, 1.1 veces para el FcγRIIaH, 1.2 veces para el FcγRIIb y 0.9 veces para el FcγRIIIaV, cuando se produjo la fijación del IL6R-B3/IL6R-L que llevaba incorporada K439E en el IL6R-G1d/IL6R-L para los correspondientes FcγR se definió como 1, y todas las fijaciones a los FcγR eran equivalentes a las del IL6R-G1d/IL6R-L. Por lo tanto, la comparación de la fijación de cada variante con la del IL6R-B3/IL6R-L antes de la alteración se puede considerar que es equivalente a comparar cada variante con el IL6R-G1d/IL6R-L que lleva la secuencia nativa de IgG1 de humano. De acuerdo con esto, en los ejemplos de aquí en adelante, la actividad de fijación de cada variante se compara con la del IL6R-B3/IL6R-L antes de la alteración.

En la tabla 1 se muestra que todas las variantes mostraban mejora de la afinidad por el FcγRIIb en comparación con el IL6R-B3 antes de la alteración, y el IL6R-BF648/IL6R-L mostraba una mejora de la afinidad de 2.6 veces, que era la más baja, y el IL6R-BP230/IL6R-L mostraba una mejora de la afinidad de 147.6 veces, que era la más alta. Por otra parte, el valor de KD(IIaR)/KD(IIb), que muestra el grado de selectividad, es de 10.0 para el IL6R-BP234/IL6R-L, que presentaba el valor más bajo, y de 32.2 para el IL6R-BP231/IL6R-L, que presentaba el valor más alto, y todas las variantes mejoraron su selectividad en comparación con el IL6R-B3/IL6R-L antes de la alteración, que mostraba un valor de 0.3. Todas las variantes mostraban menor fijación a FcγRIa, FcγRIIaH y FcγRIIIaV en comparación con el IL6R-B3/IL6R-L antes de la alteración.

[Ejemplo 3] Análisis de la estructura por rayos X de un complejo formado entre una Fc con realce de la fijación al FcγRIIb y la región extracelular de FcγRIIb y un complejo formado entre esta Fc y la región extracelular de FcγRIIaR

La variante IL6R-BP230/IL6R-L que muestra la mejora de fijación más elevada al FcγRIIb en el ejemplo 2 mostraba una mejora de la fijación de aproximadamente 150 veces al FcγRIIb, y la fijación al FcγRIIa de tipo R se suprimió a aproximadamente un incremento de 1.9 veces en comparación con la IL6R-B3/IL6R-L antes de la alteración. Por lo tanto, el IL6R-BP230/IL6R-L es una variante excelente en términos tanto de fijación como de selectividad con respecto al FcγRIIb; sin embargo, para producir variantes más excelentes, se prefiere que la fijación al FcγRIIb se mejore más a la vez que la fijación al FcγRIIaR se suprime lo máximo posible.

Tal y como se muestra en la figura 28 del ejemplo 7 de referencia, en la Fc que tiene la alteración P238D se observa la formación de una fuerte interacción electrostática entre el Asp de la posición 270 (numeración EU) del dominio B de CH2 y la Arg de la posición 131 del FcγRIIb. Mientras que este resto de la posición 131 es His en el FcγRIIIa y en el FcγRIIa de tipo H, es Arg en el FcγRIIa de tipo R, igual que en el caso del FcγRIIb. Como resultado, no hay ninguna diferencia en las interacciones en esta porción y esta es la razón por la que es difícil traer consigo la selectividad por el FcγRIIa de tipo R.

Mientras tanto, la región extracelular de FcγRIIa y de FcγRIIb concuerdan al 93% en su secuencia de aminoácidos, es decir, tienen una homología muy alta. Cuando se analizó la estructura del cristal del complejo formado entre la Fc de la IgG1 nativa (de aquí en adelante «Fc(tipo silvestre)») y la región extracelular de FcγRIIa de tipo R (*J. Imunol*. 2011, 187, 3208-3217), se encontró que las diferencias de aminoácidos en torno a una interfase de interacción entre el FcγRIIa de tipo R y el FcγRIIb eran solo tres (Gln127, Leu132 y Phe160), y se esperaba que la mejora de la selectividad frente al FcγRIIa de tipo R fuera muy difícil.

Por lo tanto, para conseguir unos adicionales realce de la selectividad y realce de la actividad de fijación al FcγRIIb, los presentes inventores consideraron que las mutaciones de aminoácido que debían introducirse se deberían evaluar en detalle para dilucidar desde el punto de vista conformacional las sutiles diferencias de interacción ocasionadas por la diferencia en los receptores mediante la obtención de no solo la estructura tridimensional del complejo formado entre una Fc con realce de la fijación al FcγRIIb y la región extracelular de FcγRIIb, sino también, y de manera simultánea, la estructura tridimensional de un complejo formado con la región extracelular de FcγRIIa de tipo R para el cual se considera más difícil la mejora de la selectividad. A continuación, se realizaron los análisis de la estructura por rayos X en un complejo formado entre la región extracelular de FcγRIIb y la Fc(P208), en donde se retira la alteración K439E de Fc del IL6R-BP208/IL6R-L (producido en el ejemplo 9 de referencia), que es una variante utilizada como base para producir el IL6R-BP230/IL6R-L, y un complejo formado entre la región extracelular de la FcγRIIa de tipo R y la Fc(P208).

3-1. Análisis de la estructura por rayos X de un complejo formado entre Fc(P208) y la región extracelular de FcγRIIb

Se determinó la estructura tridimensional del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb mediante el análisis de la estructura por rayos X a una resolución de 2.81 Å. La estructura obtenida como resultado de este análisis se muestra en la figura 5. La región extracelular de FcγRIIb está fijada entre dos dominios CH2 de Fc, y es similar a la estructura tridimensional de los complejos formados entre la Fc(tipo silvestre) que es una Fc de una IgG nativa y la correspondiente región extracelular de FcγRIIIa (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, 108, 12669-126674), de FcγRIIIb (*Nature*, 2000, 400, 267-273; *J. Biol. Chem*. 2011, 276, 16469-16477) o de FcγRIIa analizadas hasta ahora.

Sin embargo, el análisis detallado reveló que en el complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb, la estructura del lazo de las posiciones 233 a 239 (numeración EU) que continúa desde la región bisagra del dominio A del CH2 de Fc cambió en comparación con la del complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIa de tipo R debido a la introducción de las mutaciones G237D y P238D (figura 6). Como resultado, se observó la formación de un puente de hidrógeno fuerte entre la cadena principal del el Asp de la posición 237 (numeración EU) de Fc(P208) y la cadena lateral de la Tyr de la posición 160 de FcγRIIb (figura 7). Como esta Tyr160 es Phe tanto en el tipo H como en el tipo R de FcγRIIa, es imposible que se forme el puente de hidrógeno. Por lo tanto, se consideró que este puente de hidrógeno tiene una contribución importante para la adquisición de la selectividad que tiene relación con el realce de la actividad de fijación al FcγRIIb y la disminución en la actividad de fijación al FcγRIIa.

Por otra parte, la cadena lateral del Asp de la posición 237 (numeración EU) de Fc(P208) no muestra ninguna interacción notable con el FcγRIIb y no se observa ninguna interacción con los restos dentro de la Fc. La Ile de la posición 332 (numeración EU), el Glu de la posición 333 (numeración EU) y la Lys de la posición 334 (numeración EU) en Fc estaban colocados muy cerca en torno a este Asp de la posición 237 (numeración EU) (figura 8). Si la estructura del lazo se puede estabilizar con la sustitución de estas posiciones por restos hidrófilos para formar la interacción con la cadena lateral del Asp de la posición 237 (numeración EU), se puede disminuir la pérdida de energía entrópica que acompaña a la formación del puente de hidrógeno con la Tyr de la posición 160 del FcγRIIb, y esto puede conducir a un incremento de la energía libre de fijación, es decir, al realce de la actividad de fijación.

La comparación de la estructura del cristal por rayos X del complejo formado entre la Fc(P238D) que lleva la alteración P238D y la región extracelular de FcγRIIb, que se muestra en el ejemplo 7 de referencia, y la estructura del cristal por rayos X del complejo formado entre la Fc(P208) y la región extracelular de FcγRIIb, mostraba que en comparación con Fc(P238D), la Fc(P208) contiene cinco nuevas mutaciones y la mayoría de ellas eran solo cambios a nivel de la cadena lateral. Sin embargo, al alterar la Pro de la posición 271 (numeración EU) por Gly en el dominio B del CH2 de Fc, se observó un cambio en la localización a nivel de la cadena principal, y los cambios estructurales habían tenido lugar en el lazo cadena arriba formado por las posiciones 266-270 (numeración EU) (figura 9). Tal y como se muestra en el ejemplo 8 de referencia, en la Fc(P238D) se ha sugerido que la porción de Pro en la posición 271 (numeración EU) puede estar tensa desde el punto de vista estereoquímico cuando el Asp de la posición 270 (numeración EU) forma una interacción electrostática fuerte con la Arg de la posición 131 del FcγRIIb. Los cambios estructurales observados esta vez al introducir la Gly en la posición 271 (numeración EU) puede ser el resultado de liberar la tensión estructural acumulada en la porción de Pro antes de la alteración, y la cantidad de tensión liberada se considera que ha conducido a la mejora de la energía libre de fijación con el FcγRIIb, es decir, la mejora de la actividad de fijación.

Además, se confirmó que la Arg de la posición 292 (numeración EU) está sometida a cambios estructurales cuando toma dos formas como resultado de los cambios estructurales del lazo de las posiciones 266-271 (numeración EU). En este caso, la Arg de la posición 292 (numeración EU) forma interacciones electrostáticas con el Asp de la posición 268 (numeración EU) que es uno de los otros restos alterados en la Fc(P208) (figura 9), y esto puede contribuir a la estabilización de esta estructura de lazo. La interacción electrostática formada entre el Asp de la posición 270 (numeración EU) en este lazo y la Arg de la posición 131 del FcγRIIb contribuye enormemente a la actividad de fijación al FcγRIIb; por lo tanto, la introducción de la alteración H268D puede haber conducido a la reducción de la pérdida de la energía entrópica que acompaña a la fijación y al incremento de la energía libre de fijación, es decir, el realce de la actividad de fijación por la estabilización de la conformación de esta estructura de lazo en su forma fijada al FcγRIIb.

Cuando se llevaron a cabo otras investigaciones por la posibilidad de que hubiera alteraciones que realzaran aún más la actividad basándose en los resultados del análisis estructural, se halló que la Ser de la posición 239 (numeración EU) era una de las posiciones candidatas para introducirle alteraciones. Tal y como se muestra en la figura 10, esta Ser de la posición 239 (numeración EU) del dominio B de CH2 está colocada en la dirección hacia la que la Lys de la posición 117 del FcγRIIb se extiende de la manera más natural desde el punto de vista estructural. Sin embargo, dado que en este análisis no se detectó la densidad electrónica de la Lys de la posición 117 del FcγRIIb, este resto de Lys no forma una estructura estacionaria. Así pues, en la actualidad se considera que este resto de Lys está poco implicado en la interacción con la Fc(P208); sin embargo, si se altera esta Ser de la posición 239 (numeración EU) del dominio B de CH2 por Asp o Glu cargados negativamente, se puede esperar alguna interacción electrostática con la Lys cargada positivamente de la posición 117 del FcγRIIb y, como resultado, se puede esperar que mejore la actividad de fijación al FcγRIIb.

Por otra parte, al observar la estructura de la Ser de la posición 239 (numeración EU) en el dominio A de CH2, se considera que la cadena lateral de este aminoácido forma puentes de hidrógeno con la cadena principal de la Gly de la posición 236 (numeración EU) y que estabilice la estructura del lazo desde la posición 233 a la 239 que continúa desde la región bisagra e incluye el Asp de la posición 237 (numeración EU) que forma un puente de hidrógeno con la cadena lateral de la Tyr160 del FcγRIIb (figura 7). La estabilización de esta estructura de lazo en la conformación tomada durante la fijación puede conducir a la reducción de la pérdida de energía entrópica que acompaña a la fijación y, como resultado, la mejora de la

energía libre de la fijación, es decir, la mejora de la actividad de fijación. Por otra parte, si esta la Ser de la posición 239 (numeración EU) en el dominio A de CH2 se altera a Asp o Glu, se puede perder el puente de hidrógeno con la cadena principal de la Gly de la posición 239 (numeración EU) y puede ocasionar la repulsión electrostática entre el Asp de la posición 265 (numeración EU) que está presente y muy cercano, y esto puede conducir a una importante desestabilización de la estructura del lazo. Esta energía desestabilizada sirve para disminuir la energía libre de fijación con el FcγRIIb; por lo tanto, esto puede conducir a la disminución de la actividad de fijación.

[Expresión y purificación de la Fc(P208)]

Se preparó la Fc(P208) del siguiente modo. Primero se produjo el IL6R-P208 mediante la alteración del Glu de la posición 439 (numeración EU) del IL6R-BP208 (SEQ ID n.º 24) por Lys, que es la secuencia de una IgG1 de humano nativa. A continuación, se sustituyó la Cys de la posición 220 (numeración EU) del IL6R-P208 por Ser. A continuación, se clonó por PCR la secuencia genética de la Fc(P208) desde el Glu de la posición 216 (numeración EU) hasta el extremo carboxilo. Con esta secuencia genética clonada, se llevó a cabo la producción de los vectores de expresión y la expresión y purificación de la Fc(P208) de acuerdo con el método del ejemplo 1 de referencia. La Cys de la posición 220 (numeración EU) forma un puente disulfuro con la Cys de la cadena L en la IgG1 general. La cadena L no se coexpresa cuando se prepara la Fc sola y, por lo tanto, este resto se sustituyó por Ser para evitar la formación de puentes disulfuro innecesarios.

[Expresión y purificación de la región extracelular de FcγRIIb]

Esto se preparó de acuerdo con el método del ejemplo 2 de referencia.

[Purificación del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb]

A 1.5 mg de la muestra de la región extracelular de FcγRIIb obtenida por cristalización se le añadieron 0.15 mg de Endo F1 (*Protein Science* 1996, 5: 2617-2622) expresado y purificado de *Escherichia coli* como una proteína de fusión con la glutatión *S*-transferasa. Esto se dejó reposar a temperatura ambiente durante tres días en el tampón de Bis-Tris a 0.1 M a pH 6.5 y se escindió el oligosacárido unido por *N*, lo que lo dejaba la *N*-acetilglucosamina unida directamente a la Asn. A continuación, esta muestra de la región extracelular de FcγRIIb sometida al tratamiento de escisión de glúcidos se concentró por ultrafiltración con 5000 MWCO y se purificó por cromatografía de filtración en gel (Superdex200 10/300) con una columna equilibrada en HEPES a 20 mM a pH 7.5 que contiene NaCl a 0.1 M. Además, a la fracción de la región extracelular de FcγRIIb de la que se ha escindido el polisacárido se le añadió la Fc(P208) de tal forma que la relación molar de la región extracelular de FcγRIIb estuviera presente en un ligero exceso y, después de la concentración mediante ultrafiltración con 10 000 MWCO, se obtuvo una muestra del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb mediante purificación por cromatografía de filtración en gel (Superdex200 10/300) mediante una columna equilibrada en HEPES a 25 mM a pH 7.5 que contiene NaCl a 0.1 M.

[Cristalización del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb]

Una muestra del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb se concentró hasta aproximadamente 10 mg/ml con un filtro de ultrafiltración de 10 000 MWCO y se cristalizó con el método de difusión de vapor con gotas en suspensión en combinación con el método de siembra. Para la cristalización, se utilizó la placa VDXm (Hampton Research). Con el uso de una solución del reservorio que contiene Bis-Tris a 0.1 M (pH 6.5), PEG3350 al 19% (p/v) y fosfato de potasio dibásico a 0,2 M, se prepararon las gotas de cristalización a una relación de mezcla de solución del reservorio:muestra para cristalización = 0.85 µl:0.85 µl. Los cristales del complejo obtenido en la misma condición se molieron con Seed Bead (Hampton Research) para preparar una solución de cristales que harán de semilla. A las gotas para cristalización se les añadieron 0.15 µl de una solución diluida producida a partir de la solución de cristales de semilla, que se sellaron en los pocillos que contienen reservorios, y se dejó reposar a 20 °C. Esto produjo con éxito cristales laminados.

[Medición de los datos de difracción por rayos X de un cristal del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb]

Uno de los cristales independientes obtenidos del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb se empapó en una solución de Bis-Tris a 0.1 M, pH 6.5, PEG3350 al 24% (p/v), fosfato de potasio dibásico a 0.2 M, etilenglicol al 20% (v/v). El cristal se pescó de la solución con una aguja que lleva unido un gancho de nilón diminuto y se congeló en nitrógeno líquido; y a continuación se midieron los datos de difracción por rayos X mediante BL32XU en Spring-8. Durante la medición, el cristal estuvo colocado constantemente en una corriente de nitrógeno a –178 °C para mantenerlo en un estado congelado, y se recogieron 300 imágenes de difracción por rayos X mediante el detector MX-225HE CCD (RAYONIX) unido a una línea de haces con rotación del cristal de 0.6° cada vez. La determinación de los parámetros reticulares, la indexación de los puntos de difracción y el procesamiento de los datos de difracción de las imágenes de difracción obtenidas se llevó a cabo con el programa Xia2 (*J. Appl. Cryst*. 2010, 43: 186-190), el paquete XDS (*Acta*. *Cryst*. 2010, D66: 125-132) y Scala (*Acta*. *Cryst*. 2006, D62: 72-82); y, finalmente, se obtuvieron los datos de intensidad de difracción a una resolución de hasta 2.81 Å. El cristal pertenece al grupo espacial

$C222_1$, y tiene los siguientes parámetros de rec: a = 156.69 Å, b = 260.17 Å, c = 56.85 Å, α = 90°, β = 90°, γ = 90°.

[Análisis de la estructura por rayos X del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb]

Se determinó la estructura del cristal del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb mediante el método de remplazo molecular que utiliza el programa Phaser (*J. Appl. Cryst.* 2007, 40: 658-674). A partir del tamaño de la red cristalina obtenida y de la masa molecular del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb, se predijo que el número de complejos en la unidad asimétrica era uno. A partir de las coordenadas estructurales del PDB de código 3SGJ, que es la estructura del cristal del complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIIa, las porciones de los restos aminoacídicos de las posiciones 239-340 de la cadena A y las posiciones 239-340 de la cadena B se tomaron como coordenadas independientes y se utilizaron, correspondientemente, como modelos para buscar los dominios CH2 de Fc. Las posiciones de los restos aminoacídicos de las posiciones 341-444 de la cadena A y las posiciones 341-443 de la cadena B se tomaron como un solo conjunto de coordenadas a partir de las mismas coordenadas estructurales del PDB de código 3SGJ; y esto se utilizó como modelo para buscar los dominios CH3 de Fc. Finalmente, a partir de las coordenadas estructurales del PDB de código 2FCB, que es una estructura del cristal de la región extracelular de FcγRIIb, se tomaron las porciones de los restos aminoacídicos de las posiciones 6-178 de la cadena A y se utilizaron como modelo para buscar la Fc(P208). Los presentes inventores intentaron determinar las orientaciones y las posiciones de cada modelo de búsqueda de los dominios CH3 de Fc, región extracelular de FcγRIIb y dominio CH2 de Fc en la red cristalina mediante la función de rotación y la función de translación, pero fallaron a la hora de determinar la posición de uno de los dominios CH2. A continuación, con referencia a la estructura del cristal del complejo de Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIIa, se determinó la posición del último dominio CH2 a partir de un mapa de densidad electrónica que se calculó sobre la base de la fase determinada a partir de las tres partes restantes. Así pues, los presentes inventores obtuvieron un modelo inicial para la estructura del cristal del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb. Cuando se llevó a cabo el refinamiento del cuerpo rígido que mueve los dos dominios CH2 de Fc, los dos dominios CH3 de Fc y la región extracelular de FcγRIIb sobre el modelo inicial obtenido, el factor de fiabilidad cristalográfica, el valor de R, llegó a ser del 42.6% y el valor de R libre llegó a ser del 43.7% para los datos de intensidad de difracción desde 25 Å a 3.0 Å en este punto. Por otra parte, el refinamiento estructural con el uso del programa REFMAC5 (*Acta Cryst*. 2011, D67, 355-367), y la revisión del modelo para observar los mapas de densidad electrónica cuyo coeficiente tiene 2Fo-Fc o Fo-Fc, que se calculan sobre la base del factor Fo estructural determinado experimentalmente, el factor Fc estructural calculado y la fase calculada con el uso del modelo, se llevaron a cabo mediante el programa Coot (*Acta Cryst*. 2010, D66: 486-501) y el refinamiento del modelo se realizó mediante la repetición de estas etapas. Finalmente, como resultado de la incorporación de moléculas de agua en el modelo basado en los mapas de densidad electrónica que utilizan 2Fo-Fc o Fo-Fc como coeficiente, y el posterior refinamiento, el factor de fiabilidad cristalográfica, los valores de R y el valor de R libre del modelo que contiene 4786 átomos que no son de hidrógeno alcanzaron el 24.5% y el 28.2% para 27 259 datos de intensidad de difracción a partir de una resolución de 25 Å a 2.81 Å, respectivamente.

3-2. Análisis de la estructura por rayos X de un complejo formado entre Fc(P208) y la región extracelular de FcγRIIa de tipo R

Como resultado del análisis estructural, la estructura del cristal del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIa de tipo R se determinó a una resolución de 2.87 Å. La estructura del cristal del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIa de tipo R se comparó con la estructura del cristal del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb mostrada en el ejemplo 3-1, y como reflejo de la altísima homología de aminoácidos entre los dos receptores, no se observó apenas ninguna diferencia para las estructuras globales (figura 11). Sin embargo, cuando se examinó la estructura con detalle a nivel de la densidad electrónica, se hallaron diferencias que se pueden utilizar para mejorar la selectividad. En el FcγRIIa de tipo R, el resto de la posición 160 era Phe en vez de Tyr, y tal y como se muestra en la figura 12, donde esta Phe no puede formar un puente de hidrógeno con la cadena principal del resto aminoacídico de la posición 237 (numeración EU) del dominio A del CH2 de Fc, que estaba presente en la fijación entre el FcγRIIb y la Fc que contiene la alteración P238D. Aunque esto puede ser el principal factor para la mejora de la selectividad por el FcγRIIa de tipo R mediante la introducción de la alteración P238D, la comparación adicional a nivel de la densidad electrónica demostró que en el complejo formado con el FcγRIIb se puede confirmar la densidad electrónica de las cadenas laterales de la Leu de la posición 235 (numeración EU) y de la Leu de la posición 234 (numeración EU) en el dominio A del CH2 de Fc, mientras que la densidad electrónica de estas cadenas laterales no estaba clara en el complejo formado con el FcγRIIa de tipo R y el lazo en torno a la posición 237 (numeración EU) parece ser fluctuante como resultado de la disminución de la interacción con el FcγRIIa de tipo R en torno a esta región. Por otra parte, cuando las estructuras de la misma región se comparan por el dominio B de CH2 (figura 13), la densidad electrónica para el Asp de la posición 237 (numeración EU) se puede confirmar en la estructura del complejo formado con el FcγRIIb, mientras que la densidad electrónica a aproximadamente tres restos cadena arriba del Asp de la posición 237 (numeración EU) se puede confirmar para el complejo formado con el FcγRIIa de tipo R, y se comparó con la de la fijación al FcγRIIb, donde una región más extensa parece utilizarse para la interacción. Lo mencionado más arriba sugirió que, en la región de las posiciones 234 a 238 (numeración EU) de la

Fc(P208), el lado del dominio A de CH2 puede contribuir, en buena parte, a la fijación al FcγRIIb, y que lado del dominio B de CH2 puede contribuir, en buena parte, a la fijación al FcγRIIaR.

[Expresión y purificación de la región extracelular de FcγRIIa de tipo R]

Esto se preparó de acuerdo con el método del ejemplo 2 de referencia.

[Purificación del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIa de tipo R]

A 1,5 mg de la muestra purificada de la región extracelular de FcγRIIa de tipo R se le añadieron 0.15 mg de Endo F1 (*Protein Science* 1996, 5, 2617-2622) expresada y purificada de *Escherichia coli* como una proteína de fusión con la glutatión S-transferasa, y se le añadieron 20 µl de Endo F2 (QA-bio) a 5 U/ml y 20 µl de Endo F3 (QA-bio) a 5 U/ml. Esto se dejó reposar a temperatura ambiente durante nueve días en una condición de tampón de acetato de sodio a 0.1 M (pH 4.5) y, a continuación, se le añadieron 0.07 mg of Endo F1 (*Protein Science* 1996, 5, 2617-2622) expresada y purificada de *Escherichia coli* como una proteína de fusión con la glutatión S-transferasa, y se le añadieron 7.5 µl de Endo F2 (QA-bio) a 5 U/ml y 7.5 µl de Endo F3 (QA-bio) a 5 U/ml. Esto se dejó reposar durante tres días más y se escindió el oligosacárido unido a N, mientras que se dejó la *N*-acetilglucosamina directamente unida a la Asn. A continuación, esta muestra del dominio extracelular de FcγRIIa de tipo R sometida a un tratamiento de escisión de la cadena de polisacárido se concentró con el uso de un filtro de ultrafiltración 10 000 MWCO, y se purificó mediante cromatografía de filtración en gel (Superdex200 10/300) con una columna equilibrada con HEPES a 25 mM (pH 7) y NaCl a 0.1 M. Además, a la fracción de la región extracelular de FcγRIIa de tipo R de la que se escindió la cadena de polisacárido se le añadió la Fc(P208) de tal forma que la relación molar de la región extracelular de FcγRIIa de tipo R estuviera presente en un ligero exceso y, después de la concentración con el uso de un filtro de ultrafiltración de 10 000 MWCO, se obtuviera una muestra del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIa de tipo R mediante purificación por cromatografía de filtración en gel (Superdex200 10/300) con una columna equilibrada en HEPES a 25 mM (pH 7) y NaCl a 0.1 M.

[Cristalización del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIa de tipo R]

Una muestra del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIa de tipo R concentrado hasta aproximadamente 10 mg/ml con un filtro de ultrafiltración de 10 000 MWCO se cristalizó mediante el método de difusión con vapor de gotas en reposo. Con el uso de una solución del reservorio de Bis-Tris a 0.1 M (pH 7.5), PEG3350 al 26% (p/v), sulfato de amonio a 0.2 M, se prepararon las gotas de cristalización a una relación de mezcla de solución del reservorio:muestra para cristalización = 0.8 µl:1.0 µl. A continuación, las gotas se sellaron bien herméticas y se dejaron reposar a 20 °C. Esto dio como resultado la producción de cristales laminados.

[Medición de los datos de difracción por rayos X del cristal del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIa de tipo R]

Un único cristal preparado del complejo Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIa de tipo R se sumergió en una solución de Bis-Tris a 0.1 M (pH 7.5), PEG3350 al 27.5% (p/v), sulfato de amonio a 0.2 M y glicerol al 20% (v/v). A continuación, el cristal se sacó de la solución con el uso de una aguja que lleva unido un gancho de nilón diminuto y se congeló en nitrógeno líquido. Se midieron los datos de difracción por rayos X del único cristal en una instalación de radiación de sincrotón Photon Factory BL-17A en la High Energy Accelerator Research Organization. El cristal se colocó constantemente en una corriente de nitrógeno a –178°C para mantenerlo en estado de congelación durante la medición. Se recogieron 225 imágenes de difracción por rayos X del único cristal con un detector CCD Quantum 315r (ADSC) equipado en la línea de haces con rotación del cristal de 0.6° cada vez. Basándose en las imágenes de difracción obtenidas, se realizaron la determinación de las constantes reticulares, la indexación de los puntos de difracción y el procesamiento de los datos de difracción con los programas Xia2 (*J. Appl. Cryst*. (2010) 43, 186-190), XDS Package (*Acta Cryst*. (2010) D66, 125-132) y Scala (*Acta Cryst*. (2006) D62, 72-82). Finalmente, se obtuvieron los datos de intensidad de difracción con una resolución de hasta 2.87 Å. El cristal pertenece al grupo espacial $C222_1$ con las constantes reticulares a = 154.31 Å, b = 257.61 Å, c = 56.19 Å, α = 90°, β = 90° y γ = 90°.

[Análisis de la estructura del cristal por rayos X del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIa de tipo R]

Se determinó la estructura mediante el método de remplazo molecular con el programa Phaser (*J. Appl. Cryst*. (2007) 40, 658-674). El número de complejos en una unidad asimétrica se estimó que era del tamaño de la red cristalina obtenida y la masa molecular del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIa de tipo R. Mediante el uso, como modelo de búsqueda, de la estructura cristalográfica del complejo Fc(P208)/región extracelular de FcγRIIb obtenida tal y como se describe en el ejemplo 3-1, se determinaron la orientación y la posición en las redes cristalinas basándose en la función de rotación y en la función de traslación. El valor del factor R de la fiabilidad cristalográfica para los datos de la intensidad difractada de 25 a 3.0 Å era del 38.4% y el valor del R libre era del 38.0% después del refinamiento de los cuerpos rígidos del modelo inicial obtenido que mueve los dos dominios CH2 y los dos dominios CH3 de la Fc, y la región

extracelular de FcγRIIa de tipo R. A continuación, se logró el refinamiento del modelo estructural mediante la repetición del refinamiento estructural con el programa REFMAC5 (*Acta Cryst*. (2011) D67, 355-367) seguido de la revisión del modelo realizado mediante el programa Coot (*Acta Cryst*. (2010) D66, 486-501) con referencia a los mapas de densidad electrónica en donde se calcularon los coeficientes 2Fo-Fc y Fo-Fc mediante el factor Fo estructural determinado experimentalmente, el factor Fc estructural calculado de acuerdo con el modelo, y las fases calculadas de acuerdo con el modelo. Finalmente, como resultado de la incorporación de las moléculas de agua en el modelo basado en los mapas de densidad electrónica que utilizan 2Fo-Fc o Fo-Fc como coeficiente, y el posterior refinamiento, el factor de fiabilidad cristalográfica, los valores de R y el valor de R libre del modelo que contiene 4758 átomos que no son de hidrógeno alcanzaron el 26.3% y el 29.8% para 24 838 datos de intensidad de difracción a partir de una resolución de 25 Å a 2.87 Å, respectivamente.

[Ejemplo 4] Variantes de Fc cuyos sitios alterados se determinaron a partir de las estructuras de los cristales

Tal y como se muestra en el ejemplo 3, se sugirió que la interacción electrostática entre el Asp de la posición 268 (numeración EU) y la Arg de la posición 292 (numeración EU) se forma como resultado de los cambios estructurales cercanos que acompañan a la introducción de la alteración P271G en el dominio B del CH2 de la variante Fc(P208) que se fija mejor al FcγRIIb (figura 9). Esta interacción se encarga de estabilizar la estructura de lazo de las posiciones 266 a 271 (numeración EU) y, como resultado, puede haber contribuido al realce de la fijación al FcγRIIb. De acuerdo con esto, se examinó si se acaba realzando la interacción con el FcγRIIb cuando se fortalece la interacción electrostática con la Arg de la posición 292 del FcγRIIb para estabilizar esta estructura de lazo al alterar el Asp de la posición 268 (numeración EU) por Glu. Por otra parte, tal y como se muestra en la figura 8, la Tyr de la posición 160 (numeración EU) del FcγRIIb forma puentes de hidrógeno con la cadena principal del Asp de la posición 237 (numeración EU) del dominio A del CH2 de Fc(P208), y desempeña una función importante en la fijación con el FcγRIIb. Aunque la porción de la cadena lateral del Asp de la posición 237 (numeración EU) no forma ninguna interacción particular, la Ile de la posición 332 (numeración EU), el Glu de la posición 333 (numeración EU) y la Lys de la posición 334 (numeración EU) están colocados cerca en la molécula. Se llevó a cabo la evaluación de si la sustitución de estos sitios por restos hidrófilos para fortalecer la interacción con el Asp de la posición 237 (numeración EU) y estabilizar la estructura de lazo cerca de este resto realzará la interacción con la Tyr de la posición 160 del FcγRIIb.

Se produjeron variantes por la introducción de H268E, I332T, I332S, I332E, I332K, E333K, E333R, E333S, E333T, K334S, K334T y K334E individualmente en el IL6R-BP230/IL6R-L (SEQ ID n.º 27/SEQ ID n.º 21) que se produjo en el ejemplo 2. El IL6R-L (SEQ ID n.º 21) se utilizó como la cadena L común del anticuerpo. Estas variantes se utilizaron para la expresión y purificación del anticuerpo de acuerdo con el método del ejemplo 1 de referencia, y la fijación a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIa de tipo H, FcγRIIa de tipo R, FcγRIIb, y FcγRIIIa de tipo V) se valoró con el método del ejemplo 2 de referencia.

La KD de cada variante para cada FcγR se muestra en la tabla 2. «Alteración» en la tabla hace referencia a una alteración introducida en el IL6R-BP3 (SEQ ID n.º 23). El IL6R-B3/IL6R-L que se utiliza como el modelo para producir el IL6R-BP230 está indicado mediante un asterisco (*). En la tabla, «KD(IIb) del polipéptido original/KD(IIb) del polipéptido alterado» muestra el valor obtenido al dividir el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para el FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para el FcγRIIb. Entre tanto, «KD(IIaR) del polipéptido original/KD(IIaR) del polipéptido alterado» muestra el valor obtenido al dividir el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para el FcγRIIaR entre el valor de KD de cada variante para el FcγRIIaR. «KD(IIaR)/KD(IIb)» muestra el valor obtenido al dividir la KD de cada variante para el FcγRIIaR entre la KD de cada variante para el FcγRIIb. Cuanto mayor es el valor, más alta es la selectividad por el FcγRIIb. En la tabla 2, las celdas rellenas de gris indican que se concluyó que la fijación de FcγR a la IgG era demasiado débil para analizarla correctamente mediante el análisis cinético y, así pues, se calculó mediante:

[Ecuación 2]

$$KD = C \bullet R_{máx}/(R_{eq} - RI) - C$$

descrito en el ejemplo 2 de referencia.

[Tabla 2]

NOMBRE DE LA VARIANTE	ALTERACIÓN AÑADIDA A IL6R-BP230	KD PARA FcγRIa (mol/l)	KD PARA FcγRIIaR (mol/l)	KD PARA FcγRIIaH (mol/l)	KD PARA FcγRIIb (mol/l)	KD PARA FcγRIIIaV (mol/l)	KD(IIaR)/ KD(IIb)	KD(IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/ KD(IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO	KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/ KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO
IL6R-G1d/IL6R-L		3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-B3/IL6R-L	*	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	1.0	1.0
IL6R-BP230/IL6R-L		1.4E-08	5.7E-07	9.6E-06	2.1E-08	6.7E-05	27.5	1.9	149.0
IL6R-BP264/IL6R-L	H268E	6.5E-09	4.8E-07	9.2E-06	1.2E-08	5.2E-05	40.6	2.3	265.0
IL6R-BP384/IL6R-L	K334R	3.0E-09	1.3E-06	1.8E-05	7.1E-08	4.5E-05	17.7	0.9	43.5
IL6R-BP390/IL6R-L	I332S	1.6E-09	4.9E-07	7.3E-06	2.1E-08	2.9E-05	22.9	2.2	144.9
IL6R-BP391/IL6R-L	I332T	9.6E-10	3.4E-07	4.4E-06	1.3E-08	1.9E-05	26.6	3.2	242.2
IL6R-BP392/IL6R-L	I332K	7.9E-09	7.3E-06	2.8E-05	9.9E-07	2.9E-05	7.3	0.2	3.1
IL6R-BP393/IL6R-L	I332R	1.1E-08	3.9E-06	4.6E-05	2.7E-06	4.8E-05	1.4	0.3	1.2
IL6R-BP465/IL6R-L	E333K	1.6E-08	6.1E-07	1.5E-05	2.1E-08	6.7E-05	29.8	1.8	151.2
IL6R-BP466/IL6R-L	E333R	1.5E-08	5.2E-07	1.1E-05	1.7E-08	2.9E-05	30.4	2.1	181.3
IL6R-BP467/IL6R-L	K334S	8.9E-10	1.1E-06	1.2E-05	4.1E-08	3.2E-05	25.8	1.0	75.4
IL6R-BP468/IL6R-L	K334T	9.7E-10	1.1E-06	9.7E-06	4.0E-08	2.7E-05	26.3	1.0	77.7
IL6R-BP469/IL6R-L	E333S	1.3E-08	6.0E-07	1.2E-05	2.3E-08	3.7E-05	26.4	1.8	136.6
IL6R-BP470/IL6R-L	E333T	1.5E-08	4.9E-07	1.0E-05	1.6E-08	3.7E-05	30.6	2.2	192.5

Se incrementaron tanto la fijación al FcγRIIb como la selectividad por el FcγRIIb que presentaban IL6R-BP264/IL6R-L, IL6R-BP465/IL6R-L, IL6R-BP466/IL6R-L e IL6R-BP470, que son resultado de introducir H268E, E333K, E333R y E333T, respectivamente, en el IL6R-BP230/IL6R-L, en comparación con las de IL6R-BP230/IL6R-L. Se redujo la selectividad por el FcγRIIb de IL6R-BP391/IL6R-L que lleva introducida la I332T, mientras que su fijación al FcγRIIb se incrementó en comparación con la de IL6R-BP230/IL6R-L.

[Ejemplo 5] Introducción exhaustiva de alteraciones en la región que rodea la posición 271 (numeración EU)

Cuando se compararon la estructura del cristal por rayos X del complejo formado entre la Fc(P238D) que lleva la alteración P238D con la región extracelular de FcγRIIb, y la estructura del cristal por rayos X del complejo formado entre la Fc(P208) con la región extracelular de FcγRIIb, la estructura cerca de la posición 271 (numeración EU) mostró el mayor cambio estructural (figura 9). Tal y como se muestra en el ejemplo 8 de referencia, en la Fc(P238D) se sugirió que cuando el Asp de la posición 270 (numeración EU) forma una interacción electrostática fuerte con la Arg de la posición 131 del FcγRIIb, la porción de la Pro de la posición 271 (numeración EU) puede estar tensa desde el punto de vista estereoquímico. En la estructura de Fc(P208)/FcγRIIb, la introducción de la alteración P271G provoca cambios posicionales a nivel de la cadena principal para retirar esta tensión estructural. Como resultado, la estructura cerca de la posición 271 (numeración EU) puede haber cambiado en buena parte. Si se pueden introducir con eficacia alteraciones que además estabilizan esta estructura cambiada, se puede reducir la pérdida de energía entrópica que acompaña a la formación de una interacción electrostática con la Arg de la posición 131 del FcγRIIb, y esto puede conducir al realce de la actividad de fijación. De acuerdo con esto, se introdujeron todas las alteraciones de la región en torno a la posición 271 (numeración EU) para cribar las alteraciones que muestran los efectos de realce de la fijación al FcγRIIb o de mejora de la selectividad por el FcγRIIb.

El IL6R-BP267 (SEQ ID n.º 29) producido por la introducción de E233D, G237D, P238D, H268E y P271G en el IL6R-B3 (SEQ ID n.º 23) se utilizó como el modelo para introducir todas las alteraciones posibles. Los aminoácidos de las posiciones 264, 265, 266, 267, 269 y 272 (numeración EU) en el IL6R-BP267 fueron sustituidos individualmente por cualquiera de los 18 aminoácidos diferentes de los aminoácidos originales y Cys. El IL6R-L (SEQ ID n.º 21) se utilizó como la cadena L común del anticuerpo. Estas variantes se utilizaron para la expresión y purificación del anticuerpo de acuerdo con el método del ejemplo 1 de referencia, y la fijación a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIa de tipo H, FcγRIIa de tipo R, FcγRIIb, y FcγRIIIa de tipo V) se valoró con el método del ejemplo 2 de referencia. De entre las variantes obtenidas, en la tabla 3 se resumen las que realzaban la fijación al FcγRIIb o que realzaban la selectividad por el FcγRIIb en comparación con las de la IL6R-BP267/IL6R-L antes de la introducción de la alteración.

[Tabla 3]

NOMBRE DE LA VARIANTE	ALTERACIÓN AÑADIDA A IL6R-BP267	KD PARA FcγRIa (mol/l)	KD PARA FcγRIIaR (mol/l)	KD PARA FcγRIIaH (mol/l)	KD PARA FcγRIIb (mol/l)	KD PARA FcγRIIIaV (mol/l)	KD(IIaR)/KD(IIb)	KD(IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/ KD(IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO	KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/ KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO
IL6R-B3/IL6R-L	*	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	1.0	1.0
IL6R-BP267/IL6R-L		4.0E-09	1.7E-06	1.9E-05	1.3E-07	5.3E-05	13.0	0.7	24.3
IL6R-BP348/IL6R-L	S267A	5.5E-10	7.0E-07	2.2E-05	4.6E-08	2.7E-05	15.3	1.5	67.6
IL6R-BP300/IL6R-L	V264I	9.6E-09	6.9E-07	2.2E-05	5.8E-08	5.6E-05	11.9	1.6	53.3
IL6R-BP367/IL6R-L	E269D	3.1E-09	1.2E-06	4.6E-05	1.0E-07	5.3E-05	11.7	0.9	30.6
IL6R-BP350/IL6R-L	S267E	8.9E-10	1.5E-07	8.3E-05	1.0E-07	8.9E-05	1.5	7.0	30.0
IL6R-BP333/IL6R-L	V266F	9.1E-09	1.5E-06	3.4E-05	1.2E-07	5.9E-05	12.5	0.7	26.4
IL6R-BP352/IL6R-L	S267G	1.8E-09	1.9E-06	2.8E-05	1.2E-07	4.3E-05	15.7	0.6	25.3
IL6R-BP339/IL6R-L	V266M	4.6E-09	1.4E-06	1.9E-05	1.3E-07	2.4E-05	11.3	0.8	24 5
IL6R-BP520/IL6R-L	E272M	3.9E-09	3.0E-06	3.1E-05	1.7E-07	4.7E-05	17.5	0.4	17.8
IL6R-BP523/IL6R-L	E272Q	3.7E-09	2.7E-06	2.9E-05	1.7E-07	4.1E-05	15.9	0.4	18.4
IL6R-BP313/IL6R-L	D265E	2.6E-08	1.3E-05	4.7E-05	8.4E-07	3.8E-05	15.6	0.1	3.7
IL6R-BP513/IL6R-L	E272D	3.8E-09	1.7E-06	3.9E-05	1.1E-07	7.5E-05	15.4	0.6	28.1
IL6R-BP521/IL6R-L	E272N	3.6E-09	2.9E-06	4.4E-05	1.9E-07	9.9E-05	15.2	0.4	16.0
IL6R-BP338/IL6R-L	V266L	1.5E-08	2.2E-06	2.2E-05	1.5E-07	2.5E-05	15.0	0.5	21.3
IL6R-BP517/IL6R-L	E272I	3-2E-09	2.1E-06	2.2E-05	1.4E-07	3.5E-05	14.7	0.5	21.5
IL6R-BP514/IL6R-L	E272F	4.3E-09	3.0E-06	6.4E-05	2.1E-07	9.1E-05	14.0	0.4	14.6

El valor de la KD de cada variante para cada FcγR se muestra en la tabla 3. En la tabla, «alteración añadida al IL6R-BP267» se refiere a una alteración introducida en el IL6R-BP267 (SEQ ID n.º 29), que se utilizó como modelo. El IL6R-B3/IL6R-L, que se utiliza como molécula original para producir el IL6R-B3, está indicado mediante un asterisco (*). En la tabla, «KD(IIb) del polipéptido original/KD(IIb) del polipéptido alterado» muestra el valor obtenido de dividir el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para el FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para el FcγRIIb. Entre tanto, «KD(IIaR) del polipéptido original/KD(IIaR) del polipéptido alterado» muestra el valor obtenido de dividir el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para el FcγRIIaR entre el valor de KD de cada variante para el FcγRIIaR. «KD(IIaR)/KD(IIb)» muestra el valor obtenido al dividir el valor de KD de cada variante para el FcγRIIaR entre el valor de KD de la variante para el FcγRIIb. Cuanto mayor es el valor, mayor es la selectividad por el FcγRIIb. En la tabla 3, las celdas rellenas de gris indican que se concluyó que la fijación de FcγR a la IgG era demasiado débil para analizarla correctamente mediante análisis cinético y, así pues, se calculó mediante:

[Ecuación 2]

$$KD = C \bullet R_{máx}/(R_{eq} - RI) - C$$

descrito en el ejemplo 2 de referencia.

Toda fijación de las variantes que se muestran en la tabla 3 a los FcγRIa, FcγRIIaH y FcγRIIIaV era comparable o se había reducido en comparación con la de IL6R-B3/IL6R-L. Mientras tanto, se incrementó la fijación al FcγRIIb que presentan las variantes que son resultado de la adición de S267A, V264I, E269D, S267E, V266F, S267G y V266M, respectivamente, al IL6R-BP267/IL6R-L en comparación con la de IL6R-BP267/IL6R-L antes de la incorporación de la alteración. Mientras tanto, se incrementaron los valores de KD(IIaR)/KD(IIb) de las variantes que son resultado de la adición de las alteraciones S267A, S267G, E272M, E272Q, D265E, E272D, E272N, V266L, E272I y E272F, respectivamente, al IL6R-BP267/IL6R-L en comparación con los de IL6R-BP267/IL6R-L antes de añadirle la alteración, lo que demuestra el efecto de mejora de la selectividad por el FcγRIIb.

[Ejemplo 6] Realce de la fijación al FcγRIIb mediante la introducción de alteraciones en la región CH3

Se ha descrito que una alteración que sustituye la Leu por Pro en la posición 396 (numeración EU) realza la fijación al FcγRIIb (*Cancer Res*. (2007) 67, 8882-8890). La posición 396 (numeración EU) está presente en una posición que no interviene directamente en la interacción con el FcγR. Sin embargo, se puede suponer que el aminoácido tiene un efecto sobre la interacción con el FcγR al cambiar la estructura del anticuerpo. Así pues, los presentes inventores valoraron si se realza la fijación al FcγRIIb o si se incrementa su selectividad por el FcγRIIb mediante la introducción de todas las posibles alteraciones de aminoácido en la posición 396 (numeración EU).

El IL6R-BP423 (SEQ ID n.º 33), producido por la introducción de E233D, G237D, P238D, S267A, H268E, P271G y A330R en el IL6R-B3 (SEQ ID n.º 23), se utilizó como modelo. Se produjeron variantes por sustitución del aminoácido de la posición 396 (numeración EU) en el IL6R-BP423 por cualquiera de los 18 aminoácidos diferentes del aminoácido original y de la cisteína. El IL6R-L (SEQ ID n.º 21) se utilizó como la cadena L común del anticuerpo. Estas variantes se utilizaron para la expresión y purificación del anticuerpo de acuerdo con el método del ejemplo 1 de referencia, y la fijación a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIa de tipo H, FcγRIIa de tipo R, FcγRIIb, y FcγRIIIa de tipo V) se valoró con el método del ejemplo 2 de referencia. La fijación de las variantes obtenidas a cada FcγR se resume en la tabla 4.

[Tabla 4]

NOMBRE DE LA VARIANTE	ALTERACIÓN AÑADIDA A IL6R-BP423	KD PARA FcγRIa (mol/l)	KD PARA FcγRIIaR (mol/l)	KD PARA FcγRIIaH (mol/l)	KD PARA FcγRIIb (mol/l)	KD PARA FcγRIIIaV (mol/l)	KD(IIaR)/KD(IIb)	KD(IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/KD(IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO	KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO
IL6R-		3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-	*	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	1.0	1.0
IL6R-		7.7E-10	1.8E-07	2.0E-06	5.1E-09	1.6E-05	34,2	6.3	604
IL6R-	P396A	9.0E-10	1.6E-07	2.0E-06	5.3E-09	2.5E-05	29.7	7.0	584
IL6R-	P396D	7.5E-10	1.3E-07	1.4E-06	4.1E-09	9.7E-06	31.7	8.5	759
IL6R-	P396E	9.1E-10	1.4E-07	1.5E-06	4.6E-09	1.2E-05	29.8	8.0	667
IL6R-	P396F	8.4E-10	1.2E-07	1.3E-06	4.1E-09	9.6E-06	29.4	9.2	763
IL6R-	P396G	9.8E-10	1.8E-07	2.0E-06	6.2E-09	1.2E-05	29.2	6.1	499
IL6R-	P396H	7.5E-10	1.3E-07	1 5E-06	5.1E-09	1.1E-05	25.9	8.3	602
IL6R-	P396I	7.5E-10	1.2E-07	9.3E-07	4.6E-09	7 4E-06	25,5	9,4	675
IL6R-	P396K	8.2E-09	1.3E-07	1.4E-06	4.8E-09	9.1E-06	27.5	8.4	649
IL6R-	P396L	7.5E-10	1.3E-07	1.6E-06	4.0E-09	8.5E-06	31.8	8.6	767
IL6R-	P396M	6.0E-10	1.2E-07	2.0E-06	3.5E-09	9.2E-06	35.3	8.9	888
IL6R-	P396N	9.1E-10	1.5E-07	2.6E-06	5.2E-09	1.3E-05	28.9	7.3	591
IL6R-	P396Q	7.8E-10	1.4E-07	1.4E-06	4.5E-09	1.1E-05	31.1	7.9	687
IL6R-	P396R	1.1E-09	1.5E-07	1.4E-06	5.1E-09	1.2E-05	28.9	7.5	607
IL6R-	P396S	8.7E-10	1.6E-07	3.2-E06	6.5E-09	1.4E-05	25.2	6.7	478
IL6R-	P396T	1.3E-09	1.3E-07	1.5E-06	5.1E-09	9.9E-06	24.4	8.8	602
IL6R-	P396V	9.7E-10	1.3E-07	1.4E-06	5.2E-09	9.0E-06	25.0	8.5	593
IL6R-	P396W	1.3E-09	1.6E-07	1.9E-06	5.6E-09	1.2E-05	28.1	7.0	554
IL6R-	P396Y	1.1-E09	1.3E-07	2.1E-06	4.0E-09	9.9E-06	31.5	8.7	773

En la tabla, «alteración añadida a IL6R-BP423» se refiere a una alteración introducida en el IL6R-BP423. El IL6R-B3/IL6R-L, que se utilizó como modelo para producir IL6R-BP423, está indicado mediante un asterisco (*). En la tabla, «KD(IIb) del polipéptido original/KD(IIb) del polipéptido alterado» muestra el valor obtenido de dividir el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para el FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para el FcγRIIb. Entre tanto, «KD(IIaR) del polipéptido original/KD(IIaR) del polipéptido alterado» muestra el valor obtenido al dividir el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para FcγRIIaR entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIaR. «KD(IIaR)/KD(IIb)» muestra el valor obtenido al dividir la KD de cada variante para FcγRIIaR entre la KD de cada variante para FcγRIIb. Cuanto mayor es el valor, más alta es la selectividad por el FcγRIIb. En la tabla 4, las celdas rellenas de gris indican que se concluyó que la fijación de FcγR a la IgG era demasiado débil para analizarla correctamente mediante análisis cinético y, así pues, se calculó mediante:

[Ecuación 2]

$$KD = C \bullet R_{máx}/(R_{eq} - RI) - C$$

descrito en el ejemplo 2 de referencia.

El resultado que se muestra en la tabla 4 demuestra que: la actividad de fijación al FcγRIIb que presentan IL6R-BP456/IL6R-L que es el resultado de introducir P396M en IL6R-BP423/IL6R-L, IL6R-BP455/IL6R-L que es el resultado de introducir P396L en IL6R-BP423/IL6R-L, IL6R-BP464/IL6R-L que es el resultado de introducir la P396Y en IL6R-BP423/IL6R-L, IL6R-BP450/IL6R-L que es el resultado de introducir P396F en IL6R-BP423/IL6R-L, IL6R-BP448/IL6R-L que es el resultado de introducir P396D en IL6R-BP423/IL6R-L, IL6R-BP458/IL6R-L que es el resultado de introducir P396Q en IL6R-BP423/IL6R-L, IL6R-BP453/IL6R-L que es el resultado de introducir P396I en IL6R-BP423/IL6R-L, IL6R-BP449/IL6R-L que es el resultado de introducir P396E en IL6R-BP423/IL6R-L, IL6R-BP454/IL6R-L que es el resultado de introducir P396K en IL6R-BP423/IL6R-L e IL6R-BP459/IL6R-L que es el resultado de introducir P396R en IL6R-BP423/IL6R-L, se incrementó en todos ellos en comparación con la de IL6R-BP423/IL6R-L antes de que se le introdujeran las alteraciones. Mientras tanto, el valor de KD(IIaR)/KD(IIb) de IL6R-BP456/IL6R-L que es el resultado de

la introducción de P396M en IL6R-BP423/IL6R-L era mayor en comparación con el de IL6R-BP423/IL6R-L antes de introducirle la alteración, lo que demuestra la mejora de la selectividad por el FcγRIIb. Tal y como se observa en la tabla 4, la afinidad de las variantes preparadas por FcγRIa, FcγRIIaH y FcγRIIIaV era menor que la de IL6R-B3/IL6R-L, que es el polipéptido original.

[Ejemplo 7] Preparación de las variantes con realce de la fijación al FcγRIIb mediante el uso de secuencias de subclase

La IgG de humano presenta sublcases que le hacen variar su perfil de fijación al FcγR. Los presentes inventores valoraron si la diferencia de afinidad por cada FcγR entre IgG1 e IgG4 se podía utilizar para incrementar la fijación al FcγRIIb y/o mejorar la selectividad.

Primero, se analizó la afinidad de IgG1 e IgG4 por cada FcγR. El IL6R-G4d (SEQ ID n.º 30) que contiene G4d se construyó como la cadena H del anticuerpo. G4d carece de las Gly y Lys del extremo carboxilo y contiene una sustitución de Pro por Ser en la posición 228 (numeración EU) de la IgG4 de humano. El IL6R-L (SEQ ID n.º 21) se utilizó como la cadena L común del anticuerpo. El IL6R-G1d/IL6R-L y el IL6R-G4d/IL6R-L se expresaron y purificaron de acuerdo con el método descrito en el ejemplo 1 de referencia. Estos se valoraron por su fijación a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIa de tipo H, FcγRIIa de tipo R, FcγRIIb o FcγRIIIa de tipo V) mediante el método descrito en el ejemplo 2 de referencia. La fijación de las variantes resultantes a cada FcγR se resume en la tabla 5.

[Tabla 5]

NOMBRE DE LA VARIANTE	KD PARA FcγRIa (mol/l)	KD PARA FcγRIIaR (mol/l)	KD PARA FcγRIIaH (mol/l)	KD PARA FcγRIIb (mol/l)	KD PARA FcγRIIIaV (mol/l)
IL6R-G1d/IL6R-L	1.2E-10	9.7E-07	6.5E-07	3.9E-06	4.2E-07
IL6R-G4d/IL6R-L	6.6E-10	2.1E-06	3.4E-06	2.6E-06	3.4E-06

En comparación con IL6R-G1d/IL6R-L, se ha encontrado que IL6R-G4d/IL6R-L tiene una fijación 1.5 veces más fuerte al FcγRIIb y una fijación 2.2 veces más débil al FcγRIIaR. Por otra parte, en comparación con IL6R-G1d/IL6R-L, el IL6R-G4d/IL6R-L tenía una afinidad más débil por FcγRIa, FcγRIIaH y FcγRIIIaV. Los resultados mencionados más arriba revelaron que, en comparación con IL6R-G1d, el IL6R-G4d tiene excelentes selectividad y fijación por el FcγRIIb.

En la figura 14 se muestra la comparación de las secuencias de G1d y G4d desde el CH1 al extremo carboxilo (posiciones 118 a 445 (numeración EU)). Los aminoácidos recuadrados de la figura 14 muestran los restos que son diferentes entre G1d y G4d. Entre estos aminoácidos diferentes se seleccionaron varios sitios que se había predicho que intervenían en la interacción con el FcγR y se examinó si se podía realzar más la selectividad y la fijación mediante la transferencia de la secuencia de G4d que tiene excelentes selectividad y fijación por el FcγRIIb en las variantes con realce por FcγRIIb.

Específicamente, se produjo el IL6R-BP473 mediante la introducción de A327G en el IL6R-BP230, se produjo el IL6R-BP472 mediante la introducción de A330S en el IL6R-BP230, se produjo el IL6R-BP471 mediante la introducción de P331S en el IL6R-BP230, se produjo el IL6R-BP474 mediante la introducción de A330S y P331S en el IL6R-BP230, se produjo el IL6R-BP475 mediante la introducción de A327G y A330S en el IL6R-BP230, se produjo el IL6R-BP476 mediante la introducción de A327G, A330S y P331S en el IL6R-BP230, y se produjo el IL6R-BP477 mediante la introducción de A327G y P331S en el IL6R-BP230. Por otra parte, el IL6R-BP478 (SEQ ID n.º 31) se produjo mediante la sustitución desde la Ala de la posición 118 hasta la Thr de la posición 225 (numeración EU) en el IL6R-BP230 por una secuencia de G4d (desde la Ala de la posición 118 hasta la Pro de la posición 222 (numeración EU)). El IL6R-L (SEQ ID n.º 21) se utilizó como la cadena L común del anticuerpo. Estas variantes se utilizaron para la expresión y purificación del anticuerpo de acuerdo con el método del ejemplo 1 de referencia, y la fijación a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIa de tipo H, FcγRIIa de tipo R, FcγRIIb, y FcγRIIIa de tipo V) se valoró con el método del ejemplo 2 de referencia.

El valor de KD de cada variante para cada FcγR se muestra en la tabla 6. En la tabla, «KD(IIb) del polipéptido original/KD(IIb) del polipéptido alterado» muestra el valor obtenido al dividir el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb. «Alteración(es) añadidas a IL6R-BP230» se refiere a una alteración introducida en el IL6R-BP230. El IL6R-B3/IL6R-L que se usó de modelo para producir el IL6R-BP230 se indica mediante *1. Mientras tanto, el IL6R-BP478 (SEQ ID n.º 31), en donde el segmento desde la Ala de la posición 118 hasta la Thr de la posición 225 (numeración EU) en el IL6R-BP230 está sustituida por la secuencia de G4d (desde la Ala de la posición 118 hasta la Pro de la posición 222 (numeración EU)) se indica mediante *2. «KD(IIaR) del polipéptido original/KD(IIaR) del polipéptido alterado» muestra el valor obtenido al dividir el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para FcγRIIaR entre el valor de KD de la variante para FcγRIIaR. «KD(IIaR)/KD(IIb)» muestra el valor obtenido al dividir la KD de cada variante para FcγRIIaR entre la KD de cada variante para FcγRIIb. Cuanto mayor es el valor, más alta es

la selectividad por el FcγRIIb. En la tabla 6, las celdas rellenas de gris indican que se concluyó que la fijación de FcγR a la IgG era demasiado débil para analizarla correctamente mediante análisis cinético y, así pues, se calculó mediante:

[Ecuación 2]

$$KD = C \bullet R_{máx}/(R_{eq} - RI) - C$$

descrito en el ejemplo 2 de referencia.

[Tabla 6]

NOMBRE DE LA VARIANTE	ALTERACIÓN(ES) AÑADIDAS A IL6R-BP230	KD PARA FcγRIa (mol/l)	KD PARA FcγRIIaR (mol/l)	KD PARA FcγRIIaH (mol/l)	KD PARA FcγRIIb (mol/l)	KD PARA FcγRIIIaV (mol/l)	KD(IIaR)/KD(IIb)	KD(IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/KD(IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO	KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO
IL6R-G1d/IL6R-L		3.2E-	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-	3.5E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-B3/IL6R-L	*1	4.2E-	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-	3.3E-07	0.3	1.0	1.0
IL6R-BP230/IL6R-		1.4E-	5.7E-07	9.6E-06	2.1E-	6.7E-05	27.5	1.9	149.0
IL6R-BP471/IL6R-	P331S	7.3E-	8.0E-07	1.2E-05	3.5E-	7 1E-05	22.7	1.4	88.1
IL6R-BP472/IL6R-	A330S	5.2E-	3.3E-06	2.4E-05	1.5E-	3.8E-05	21.5	0.3	20.3
IL6R-BP473/IL6R-	A327G	6.2E-	3.8E-07	4.8E-06	1.8E-	3.6E-05	21.1	2.9	172.2
IL6R-BP474/IL6R-	A330S/P331S	4.1E-	3.0E-06	3.7E-05	1.8E-	5.5E-05	16.6	0.4	16.9
IL6R-BP475/IL6R-	A327G/A330S	4.9E-	1.0E-06	1.5E-05	1.1E-	4.6E-05	9.7	1.1	29.2
IL6R-BP476/IL6R-	A327G/A330S/P331S	5.9E-	1.3E-06	1.9E-05	1.3E-	4.9E-05	9.7	0.9	23.7
IL6R-BP477/IL6R-	A327G/P331S	9.2E-	5.1E-07	7.6E-06	3.7E-	5.8E-05	14.0	2.2	84.9
IL6R-BP478/IL6R-	*2	7.7E-	5.4E-07	6.7E-06	1.9E-	3.5E-05	28.0	2.0	160.6

De las variantes que se muestran en la tabla 6, IL6R-BP473/IL6R-L en la que se introdujo A327G mostraba un incremento de la fijación al FcγRIIb de 1.2 veces en comparación con la de IL6R-BP230/IL6R-L. En comparación con IL6R-BP230/IL6R-L, el IL6R-BP478/IL6R-L producido al sustituir desde la Ala de la posición 118 a la Thr de la posición 225 (numeración EU) en el IL6R-BP230 por una secuencia de G4d (desde la Ala de la posición 118 hasta la Pro de la posición 222 (numeración EU)), mostraba un incremento de 1.1 veces tanto de la fijación al FcγRIIb como de la fijación al FcγRIIaR. En comparación con el IL6R-B3/IL6R-L que es el péptido original, todas las variantes tenían menor afinidad por FcγRIa, FcγRIIaH y FcγRIIIaV.

Por otra parte, tal y como se muestra en la figura 14, los otros sitios en donde los aminoácidos son diferentes entre G1d y G4d incluyen las posiciones 268, 274, 296, 355, 356, 358, 409, 419 y 445 (numeración EU). Por lo tanto, al sustituir estos sitios por los aminoácidos procedentes de IgG4, puede realzar la selectividad y la fijación por el FcγRIIb.

En el examen llevado a cabo hasta ahora, la transferencia de A327G, que es la secuencia de IgG4 de humano, a la variante IL6R-BP230/IL6R-L se mostró que realzaba la actividad de fijación al FcγRIIb. Se realizó otra evaluación para porciones que no coinciden entre las secuencias de la IgG4 y de la IgG1.

Específicamente, se produjeron variantes mediante la introducción de las siguientes alteraciones en el IL6R-BP230 a modo de cadena H del anticuerpo: se introdujo K274Q para producir IL6R-BP541; se introdujo Y296F para producir IL6R-BP542; se introdujo H268Q para producir IL6R-BP543; se introdujo R355Q para producir IL6R-BP544; se introdujo D356E para producir IL6R-BP545; se introdujo L358M para producir IL6R-BP546; se introdujo K409R para producir IL6R-BP547; y se introdujo Q419E para producir IL6R-BP548. Mientras tanto, se utilizó el IL6R-L como la cadena L común del anticuerpo. Los anticuerpos que contienen la variante de la cadena pesada de más arriba y la cadena ligera IL6R-L se purificaron de acuerdo con los métodos descritos en el ejemplo 1 de referencia. A los anticuerpos purificados se les valoró su fijación a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIaH, FcγRIIaR, FcγRIIb o FcγRIIIaV) mediante el método del ejemplo 2 de referencia.

La KD de cada variante para cada FcγR se muestra en la tabla 7. En esta tabla, «KD(IIb) del polipéptido original/KD(IIb) del polipéptido alterado» se refiere a un valor obtenido al dividir el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb. En la tabla, «alteraciones añadidas a IL6R-BP230» indica las alteraciones introducidas en el IL6R-BP230. Mientras tanto, el IL6R-B3/IL6R-L utilizado como molde para producir IL6R-BP230 está indicado como *1. «KD(IIaR) del polipéptido original/KD(IIaR) del polipéptido alterado» se refiere a un valor obtenido al dividir el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para el FcγRIIaR entre el valor de KD de cada variante para el FcγRIIaR. «KD(IIaR)/KD(IIb)» es el valor obtenido al dividir la KD de cada variante para FcγRIIaR por la KD de esta variante para FcγRIIb. Cuanto mayor es este valor, mayor es la selectividad por el FcγRIIb. En la tabla 7, los números de las celdas rellenas de gris muestran los valores calculados mediante la ecuación siguiente

[Ecuación 2]

$$KD = C \bullet R_{máx}/(R_{eq} - RI) - C$$

que se muestra en el ejemplo 2 de referencia, ya que la fijación del FcγR a la IgG se determinó que era demasiado débil para analizarla correctamente mediante el análisis cinético.

[Tabla 7]

NOMBRE DE LA VARIANTE	ALTERACIÓN INTRODUCIDA EN IL6R-BP230	KD PARA FcγRIa (mol/l)	KD PARA FcγRIIaR (mol/l)	KD PARA FcγRIIaH (mol/l)	KD PARA FcγRIIb (mol/l)	KD PARA FcγRIIIaV (mol/l)	KD(IIaR)/KD(IIb)	KD(IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/KD(IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO	KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO
IL6R-G1d/IL6R-L		3.2E-	1.0E-	6.7E-	2.6E-06	3.5E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-B3/IL6R-L	*1	4.2E-	1.1E-	7.7E-	3.1E-06	3.3E-07	0.3	1.0	1.0
IL6R-BP230/IL6R-L		1.0E-	4.9E-	9.7E-	1.8E-08	3.9E-05	28.0	2.2	175.6
IL6R-BP451/IL6R-L	K274Q	1.1E-	4.5E-	9.3E-	1.6E-08	4.1E-05	27.8	2.4	189.6
IL6R-BP542/IL6R-L	Y296F	1.3E-	4.9E-	9.7E-	2.0E-08	4.3E-05	24.4	2.2	153.7
IL6R-BP543/IL6R-L	H268Q	2.3E-	5.6E-	7.4E-	2.0E-08	4.6E-05	27.3	1.9	151.5
IL6R-BP544/IL6R-L	R355Q	9.8E-	4.8E-	1.2E-	1.7E-08	4 5E-05	28.8	2.2	183.9
IL6R-BP545/IL6R-L	D356E	9.9E-	5.7E-	9.1E-	1.7E-08	4.5E-05	32.7	1.9	178.6
IL6R-BP546/IL6R-L	L358M	9.0E-	5.0E-	1.0E-	1.5E-08	3.7E-05	32.8	2.2	204.6
IL6R-BP547/IL6R-L	K409R	1.2E-	4.9E-	7.5E-	1.9E-08	3.5E-05	25.5	2.2	162.6
IL6R-BP548/IL6R-L	Q419E	1.2E-	5.0E-	9.4E-	1.9E-08	3.4E-05	26.2	2.2	161.8

Tal y como se muestra en la tabla 7, en comparación con el IL6R-BP230/IL6R-L antes de la alteración, el IL6R-BP541/IL6R-L producido por la introducción de K274Q en el IL6R-BP230/IL6R-L, el IL6R-BP544/IL6R-L producido por la introducción de R355Q en el IL6R-BP230/IL6R-L, el IL6R-BP545/IL6R-L producido por la introducción de D356E en el IL6R-BP230/IL6R-L y el IL6R-BP546/IL6R-L producido por la introducción de L358M en el IL6R-BP230/IL6R-L tenían realzada la fijación al FcγRIIb. Entre ellos, el IL6R-BP544/IL6R-L producido por la introducción de R355Q en el IL6R-BP230/IL6R-L, el IL6R-BP545/IL6R-L producido por la introducción de D356E en el IL6R-BP230/IL6R-L y el IL6R-BP546/IL6R-L producido por la introducción de L358M en el IL6R-BP230/IL6R-L muestran un incremento de los valores de KD(IIaR)/KD(IIb) cuando se comparara con los del IL6R-BP230/IL6R-L antes de la alteración, lo que demuestra que estas alteraciones realzan también la selectividad por FcγRIIb.

[Ejemplo 8] Evaluación de la combinación de alteraciones que traen consigo la mejora de la selectividad y el realce de la fijación al FcγRIIb

Las combinaciones de las alteraciones que se hallaron en los exámenes llevados a cabo hasta ahora para mejorar la selectividad o la actividad de fijación al FcγRIIb se examinaron para conseguir más optimización.

En el IL6R-B3 se introdujo la combinación de alteraciones que consigue la mejora de la selectividad y/o el realce de la fijación al FcγRIIb en los exámenes llevados a cabo hasta ahora. Como control comparativo, el IL6R-BP253 se produjo mediante la introducción de las alteraciones S267E y L328F, que se sabe que realzan la fijación al FcγRIIb (Seung et al., *Mol. Immunol*. (2008) 45, 3926-3933), en el IL6R-B3. El IL6R-L se utilizó para la cadena L del anticuerpo. Se purificó un anticuerpo que contiene la variante de la cadena pesada mencionada más arriba y la cadena ligera de IL6R-L, que se expresa de acuerdo con el método del ejemplo 1 de referencia. La fijación del anticuerpo purificado a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIaH, FcγRIIaR, FcγRIIb o FcγRIIIaV) se valoró mediante el método del ejemplo 2 de referencia.

La KD de cada variante para cada FcγR se muestra en la tabla 8. «Alteración» en la tabla se refiere a las alteraciones introducidas en el IL6R-B3. Mientras tanto, el IL6R-B3/IL6R-L, que se utiliza como molde para producir cada una de las variantes, se indica con un asterisco (*). «KD(IIb) del polipéptido original/KD(IIb) del polipéptido alterado» se refiere a un valor obtenido al dividir el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb. Por otra parte, «KD(IIaR) del polipéptido original/KD(IIaR) del polipéptido alterado» se refiere a un valor obtenido al dividir el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para FcγRIIaR por la KD de la correspondiente variante para FcγRIIaR. «KD(IIaR)/KD(IIb)» muestra un valor obtenido al dividir la KD de cada variante para FcγRIIaR entre la KD de la correspondiente variante para FcγRIIb. Cuanto mayor es este valor, mayor es la selectividad por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIaR. «KD(IIaH)/KD(IIb)» muestra un valor obtenido al dividir la KD de cada variante para FcγRIIaH entre la KD de la correspondiente variante para FcγRIIb. Cuanto mayor es este valor, mayor es la selectividad por el FcγRIIb en comparación con el FcγRIIaH. En la tabla 8, los números de las celdas rellenas de gris son los valores calculados mediante la ecuación siguiente

[Ecuación 2]

$$KD = C \bullet R_{máx}/(R_{eq} - RI) - C$$

que se muestra en el ejemplo 2 de referencia, ya que la fijación del FcγR a la IgG se determinó que era demasiado débil para analizarla correctamente mediante el análisis cinético.

[Tabla 8]

NOMBRE DE LA VARIANTE	ALTERACIÓN	KD PARA FcgRIa (mol/l)	KD PARA FcgRIIaR (mol/l)	KD PARA FcgRIIaH (mol/l)	KD PARA FcgRIIb (mol/l)	KD PARA FcgRIIIaV (mol/l)	KD(IIaR)/ KD(IIb)	KD(IIaH)/ KD(IIb)	KD(IIaR) DEL PEPTIDO ORIGINAL/ KD(IIaR) DEL PÉPTIDO ALTERADO	KD(IIb) DEL PEPTIDO ORIGINAL/ KD(IIb) DEL PÉPTIDO ALTERADO
G1d		3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	0.3	1.1	1.2
B3	*	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	0.2	1.0	1.0
BP253	S267E/L328F	6.7E-11	2.1E-09	1.2E-06	1.1E-08	3.8E-06	0.2	107.1	526.8	276.8
BP262	G237D/P238D/H268E/P271G	1.0E-08	2.0E-06	4.5E-05	1.2E-07	5.6E-05	17.0	375.0	0.5	25.8
BP264	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D/A330R	7.4E-09	3.5E-07	2.6E-06	1.2E-06	2.6E-05	26.3	227.6	3.2	252.0
BP265	G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D/A330R	2.3E-08	6.3E-07	1.2E-05	1.5E-08	5.6E-05	41.2	786.5	1.8	203.9
BP266	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/A330R	1.4E-08	3.2E-07	1.1E-05	1.8E-08	4.0E-05	18.0	621.5	3.4	175.1
BP268	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D	4.5E-09	1.8E-06	2.1E-05	9.2E-08	2.8E-05	19.6	226.3	0.6	33.7
BP269	G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D	1.4E-08	2.2E-06	7.2E-05	1.1E-07	3.4E-04	19.6	637.2	0.5	27.4
BP423	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R	7.7E-10	1.8E-07	2.0E-06	5.1E-09	4.6E-05	34.2	380.6	5.3	805.5
BP425	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R	4.1E-09	2.2E-07	1.5E-05	9.1E-09	4.2E-05	23.6	1644.7	5.1	339.9
BP426	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269D/P271G/A330R	1.0E-09	1.6E-07	4.9E-05	5.9E-09	4.1E-05	27.6	8361.8	6.8	529.0
BP428	E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/A330R	4.9E-09	3.9E-07	4.2E-05	1.4E-08	3.8E-05	28.0	3000.0	2.8	221.4
BP429	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/A330R	8.2E-09	1.7E-07	3.5E-06	5.4E-09	6.9E-05	31.5	648.1	6.5	514.1
BP430	E233D/G237D/P238D/V264L/S267G/H268E/P271G/A330R	1.7E-08	2.2E-07	1.1E-05	1.2E-08	3.5E-05	18.5	909.1	4.9	256.2
BP431	E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/E269D/P271G/A330R	3.6E-09	4.1E-07	7.6E-06	1.2E-08	3.2E-05	34.6	649.6	2.7	265.0
BP433	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K/I332T	7.5E-10	6.8E-07	7.3E-06	3.4E-08	2.6E-05	20.0	216.0	1.6	61.7
BP434	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R/I332T	5.5E-10	3.4E-07	4.1E-06	1.2E-08	2.5E-05	27.2	333.3	3.3	252.6
BP435	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R/I332T	1.0E-09	4.2E-07	3.4E-06	1.5E-08	2.2E-05	27.1	217.9	2.6	196.7
BP436	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/I332T	2.6E-10	2.2E-07	2.1E-06	5.1E-09	1.3E-05	43.8	411.0	4.9	606.7
BP437	G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/I332T	7.5E-10	2.2E-07	3.4E-06	5.9E-09	1.1E-05	37.7	236.5	4.9	523.6
BP438	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/I332T	2.1E-10	1.8E-07	1.6E-06	5.5E-09	6.8E-06	32.7	293.6	6.2	568.8
BP439	E233D/G237D/P238D/V264I/V266L/S267A/H268E/P271G/A330R	8.7E-09	1.3E-07	2.8E-06	6.1E-09	6.6E-05	20.9	460.5	6.7	509.9
BP440	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/A330R	8.7E-09	1.3E-07	3.6E-06	5.2E-09	2.8E-05	24.0	397.1	6.6	588.0
BP441	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/P271G/A330R	1.7E-08	3.6E-07	6.5E-06	1.5E-08	3.7E-05	24.0	582.8	2.0	265.5
BP442	E233D/G237D/P238D/H268E/E269D/P271G/A330R	4.5E-09	3.5E-07	4.7E-06	1.2E-08	2.5E-05	30.6	379.0	2.5	256.0
BP443	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/E269D/P271G/A330R	1.6E-08	5.1E-07	8.5E-06	2.3E-08	2.3E-05	21.7	406.0	2.2	132.5
BP445	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R	2.0E-09	8.3E-08	1.5E-06	2.8E-09	2.4E-05	31.0	561.4	13.8	1201.6
BP479	E233D/G237D/P238D/V264I/V266L/S267A/H268E/P271G	5.3E-09	9.0E-07	1.5E-05	5.6E-08	4.0E-05	16.1	268.3	1.2	55.5
BP480	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/E269D/P271G	1.3E-08	6.3E-00	2.1E-05	2.0E-07	4.6E-05	32.1	107.7	0.2	15.9
BP481	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G	1.0E-08	4.0E-07	6.8E-06	1.8E-08	2.4E-05	29.5	350.5	2.5	159.8
BP483	E233D/G237D/P238D/V266L/S267A/H268E/P271G	1.3E-09	1.3E-06	1.8E-05	7.8E-08	2.5E-05	16.8	230.8	0.8	39.7
BP484	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269D/P271G	8.2E-10	7.8E-07	1.1E-05	4.6E-08	2.5E-05	17.1	240.7	1.4	67.8
BP487	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R/P396M	1.2E-09	3.9E-08	6.4E-07	1.2E-09	1.0E-05	33.5	730.4	28.3	2695.7
BP488	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	2.2E-09	7.4E-08	1.6E-06	1.9E-09	2.0E-05	40.1	864.5	14.8	1675.7
BP489	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M	1.3E-09	4.3E-08	8.7E-07	3.0E-09	1.2E-05	47.8	870.0	25.7	3100.0
BP490	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R	4.5E-09	1.1E-07	2.4E-06	2.4E-09	2.3E-05	46.7	1000.0	9.8	1251.7
BP491	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	5.3E-09	1.2E-07	2.2E-06	3.0E-09	2.1E-05	38.8	723.7	9.3	1019.7
BP492	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G	7.9E-10	9.2E-07	1.0E-05	2.4E-08	3.6E-05	38.8	678.0	1.2	131.4
BP493	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	8.2E-10	1.1E-06	1.6E-05	2.3E-08	3.5E-05	52.1	900.5	1.0	146.9
BP494	G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	3.9E-09	2.5E-07	5.4E-06	6.8E-09	4.0E-05	36.6	820.7	4.3	471.1
BP495	G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R	8.3E-09	4.9E-07	1.2E-05	9.7E-09	3.3E-05	50.9	1243.5	2.2	321.2
BP496	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	1.2E-09	4.7E-07	3.7E-06	1.8E-08	3.0E-05	25.5	201.1	2.3	168.5
BP497	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A327G/A330R	2.1E-09	8.5E-08	9.6E-07	4.1E-09	2.8E-05	21.0	236.5	12.9	763.5
BP498	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R/P396L	1.3E-09	5.1E-08	9.3E-07	1.7E-09	1.0E-05	30.8	563.6	21.7	1678.8
BP499	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L	1.2E-09	4.9E-08	1.0E-06	1.5E-09	1.2E-05	33.8	664.9	22.3	2129.3
BP500	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	2.3E-09	7.2E-07	2.5E-05	2.4E-08	3.9E-05	29.9	1033.1	1.5	126.1
BP501	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G	2.1E-09	6.9E-07	1.4E-05	2.5E-08	1.9E-05	25.1	555.6	1.7	123.0
BP502	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R	2.1E-09	1.1E-07	1.3E-06	3.7E-09	2.4E-05	29.5	352.3	10.1	840.1
BP503	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M	1.2E-09	5.7E-08	8.6E-07	1.7E-09	2.1E-05	33.2	502.9	19.4	1812.5
BP504	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P	1.4E-09	4.5E-07	1.6E-05	2.4E-08	3.4E-05	18.5	656.4	2.4	327.6
BP505	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D	1.1E-09	4.3E-07	1.1E-05	2.1E-08	3.8E-05	20.0	514.0	2.5	344.9
BP506	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R	3.1E-09	1.2E-07	2.5E-06	3.4E-09	3.5E-05	35.1	731.0	9.2	906.4
BP507	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/A330R	2.6E-09	1.0E-07	1.8E-06	2.9E-09	2.8E-05	34.2	618.6	11.1	1065.3
BP508	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D	1.4E-09	5.4E-07	2.0E-05	2.1E-08	6.1E-05	26.0	951.5	2.0	149.0
BP509	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D	1.1E-09	5.2E-07	7.9E-06	1.8E-08	2.3E-05	29.2	443.8	2.1	174.7
BP510	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/A330R	6.0E-09	1.7E-07	4.0E-06	3.8E-09	3.5E-05	43.5	1041.7	5.8	807.3
BP511	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R	6.0E-09	1.8E-07	4.3E-06	3.5E-09	7.1E-05	50.5	1235.6	5.3	690.8
BP531	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M	9.4E-09	1.2E-07	3.5E-06	3.8E-09	2.7E-05	33.1	933.3	8.9	826.7
BP532	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M	1.2E-08	9.4E-08	1.9E-06	3.2E-09	2.6E-05	29.3	593.8	11.7	969.8
BP533	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R/P398I	7.7E-09	1.2E-07	2.6E-06	4.1E-09	2.7E-05	29.3	634.1	9.2	756.1
BP534	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L	8.3E-09	9.1E-08	1.8E-06	3.0E-09	2.5E-05	30.7	606.1	12.1	1043.8
BP535	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P398M	1.1E-08	9.2E-08	3.2E-06	4.0E-09	3.3E-05	23.2	808.0	11.9	780.9
BP536	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M	6.9E-09	7.9E-08	1.3E-06	3.0E-09	2.3E-05	26.6	431.7	13.9	1043.8
BP537	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/A330R	2.9E-08	2.7E-07	3.1E-06	6.9E-09	3.6E-05	39.1	447.3	4.1	447.3
BP538	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/A330R	5.5E-08	2.0E-07	3.0E-06	5.3E-09	3.3E-05	38.6	568.2	5.4	587.1
BP539	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R	6.4E-08	3.3E-07	5.6E-06	8.4E-09	3.4E-05	39.0	666.7	3.4	369.0
BP540	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R	9.6E-08	2.1E-07	4.6E-06	5.7E-09	3.9E-05	36.8	802.8	5.2	541.0
BP546	G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/A330R	1.8E-08	5.7E-07	3.1E-05	1.8E-08	2.4E-05	35.9	696.2	1.9	196.2
BP550	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	2.5E-08	3.4E-07	5.0E-06	7.8E-09	4.9E-05	44.2	655.3	3.3	406.3
BP551	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	3.2E-08	2.5E-07	2.8E-06	6.4E-09	3.8E-05	39.1	435.5	4.6	462.1
BP552	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	3.2E-09	9.7E-08	1.9E-06	2.6E-09	3.0E-05	37.3	723.6	11.4	1196.9
BP553	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/A330R	3.4E-09	8.6E-08	1.4E-06	3.1E-09	2.0E-05	27.8	453.1	12.8	1003.2
BP554	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/A330R	8.0E-09	1.5E-07	2.3E-06	4.4E-09	2.4E-05	32.7	518.0	7.6	698.2
BP555	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	9.4E-09	1.6E-07	3.2E-06	4.1E-09	3.0E-05	39.7	778.6	6.7	754.3
BP556	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R	4.3E-08	3.0E-07	5.8E-06	8.4E-09	6.0E-05	35.4	697.1	3.7	369.9
BP557	G237D/P238D/S267G/H268D/P271G/Y296D/A330R	1.3E-08	8.5E-07	1.5E-05	2.0E-08	2.9E-05	42.0	746.3	1.3	154.2
BP558	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/E272D/A330R	1.3E-08	3.3E-07	4.9E-06	9.0E-09	3.8E-05	36.4	543.2	3.4	343.7
BP559	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D	1.1E-09	1.6E-06	2.0E-05	2.8E-08	4.4E-05	58.4	711.7	0.7	110.3
BP560	P238D/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R	5.6E-00	4.2E-06	3.1E-05	1.8E-07	4.1E-05	22.6	168.5	0.3	16.8
BP561	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/E272D/Y296D/A330R	9.4E-09	5.1E-07	5.3E-06	1.8E-08	3.7E-05	28.0	291.2	2.2	170.3
BP562	G237D/P238D/H268D/P271G/E272D/Y296D/A330R	2.5E-08	6.8E-07	1.1E-05	2.4E-08	5.3E-05	28.0	466.1	1.6	131.4
BP563	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	1.2E-08	4.6E-07	6.3E-06	1.8E-08	3.8E-05	25.1	525.3	2.4	196.2
BP564	G237D/P238D/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R	3.1E-08	5.8E-07	1.0E-05	2.2E-08	4.9E-05	26.2	454.5	1.9	140.9
BP565	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	2.4E-09	2.3E-07	4.7E-06	5.5E-09	2.1E-05	41.5	856.1	4.8	564.7
BP567	E233D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	2.1E-10	8.9E-07	1.7E-05	1.4E-08	3.9E-05	64.4	1231.9	1.2	224.6
BP568	E233D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G	1.9E-10	6.8E-07	1.1E-05	1.5E-08	2.5E-05	46.1	748.3	1.6	210.5

Entre las variantes descritas en la tabla 8, el IL6R-BP253/IL6R-L producido al añadir las alteraciones conocidas que realzan la fijación al FcγRIIb mostraba un realce de la actividad de fijación al FcγRIIb y al FcγRIIaR de 277 veces y de 529 veces, respectivamente, en comparación con el IL6R-B3/IL6R-L antes de la alteración. Por una parte, la actividad de fijación al FcγRIa del IL6R-BP253/IL6R-L también mejoró en comparación con la de IL6R-B3/IL6R-L. Por otra parte, la fijación de IL6R-BP253/IL6R-L al FcγRIIaH y al FcγRIIIaV disminuyeron en comparación con la de IL6R-B3/IL6R-L. Entre las otras variantes, la fijación al FcγRIa mejoró ligeramente para IL6R-BP436/IL6R-L, IL6R-BP438/IL6R-L, IL6R-BP567/IL6R-L e IL6R-

BP568/IL6R-L, en comparación con la de IL6R-B3/IL6R-L antes de la alteración, pero la fijación al FcγRIa disminuyó en las otras variantes. Además, la fijación al FcγRIIaH y al FcγRIIIaV disminuyó en todas las variantes cuando se comparó con la de IL6R-B3/IL6R-L.

La comparación de las variantes producidas en este examen con la variante existente IL6R-BP253/IL6R-L que tiene realzada la fijación al FcγRIIb demostró que el valor de KD(IIaH)/KD(IIb) es de 107.7 para IL6R-BP480/IL6R-L, que mostraba el valor más bajo, y es de 8362 para IL6R-BP426/IL6R-L, que mostraba el valor más alto, y los valores para todas las variantes eran superiores a 107.1 para IL6R-BP253/IL6R-L. Por otra parte, el valor de KD(IIaR)/KD(IIb) es de 16.1 para IL6R-BP479/IL6R-L, que mostraba el valor más bajo, y es de 64.4 para IL6R-BP567/IL6R-L, que mostraba el valor más alto, y los valores de todas las variantes eran mayores que 0.2 para IL6R-BP253/IL6R-L. A partir de estos resultados, todas las variantes que se muestran en la tabla 8 se ha demostrado que son variantes con mejora de la selectividad por FcγRIIb en comparación con la variante existente en la que se introducen la alteración o alteraciones para realzar la fijación al FcγRIIb. En particular, en IL6R-BP559/IL6R-L, IL6R-BP493/IL6R-L, IL6R-BP557/IL6R-L, IL6R-BP492/IL6R-L, IL6R-BP500/IL6R-L e IL6R-BP567/IL6R-L se mantiene la fijación al FcγRIIaR a no más de 1.5 veces la de IL6R-B3/IL6R-L, y al mismo tiempo la actividad de fijación al FcγRIIb se realzó hasta 100 veces o más; por lo tanto, se esperaba que estas variantes mostrasen los efectos producidos por la fijación realzada al FcγRIIb al mismo tiempo que se evitaban los efectos secundarios ocasionados por el realce de la fijación al FcγRIIaR.

Además, en cuanto a IL6R-BP489/IL6R-L, IL6R-BP487/IL6R-L, IL6R-BP499/IL6R-L, IL6R-BP498/IL6R-L, IL6R-BP503/IL6R-L, IL6R-BP488/IL6R-L, IL6R-BP490/IL6R-L, IL6R-BP445/IL6R-L, IL6R-BP552/IL6R-L, IL6R-BP507/IL6R-L, IL6R-BP536/IL6R-L, IL6R-BP534/IL6R-L, IL6R-BP491/IL6R-L, IL6R-BP553/IL6R-L, IL6R-BP532/IL6R-L, IL6R-BP506/IL6R-L, IL6R-BP511/IL6R-L, IL6R-BP502/IL6R-L, IL6R-BP531/IL6R-L, IL6R-BP510/IL6R-L, IL6R-BP535/IL6R-L, IL6R-BP497/IL6R-L, IL6R-BP533/IL6R-L, IL6R-BP555/IL6R-L, IL6R-BP554/IL6R-L, IL6R-BP436/IL6R-L, IL6R-BP423/IL6R-L, IL6R-BP440/IL6R-L, IL6R-BP538/IL6R-L, IL6R-BP429/IL6R-L, IL6R-BP438/IL6R-L, IL6R-BP565/IL6R-L, IL6R-BP540/IL6R-L, IL6R-BP426/IL6R-L, IL6R-BP437/IL6R-L, IL6R-BP439/IL6R-L, IL6R-BP551/IL6R-L, IL6R-BP494/IL6R-L, IL6R-BP537/IL6R-L, IL6R-BP550/IL6R-L, IL6R-BP556/IL6R-L, IL6R-BP539/IL6R-L, IL6R-BP558/IL6R-L, IL6R-BP425/IL6R-L e IL6R-BP495/IL6R-L, su fijación al FcγRIIb era más alta que la de IL6R-BP253/IL6R-L que lleva la alteración existente que realza la fijación al FcγRIIb. Además, el realce de la fijación al FcγRIIb oscila de 321 veces (la más baja) a 3100 veces (la más alta) en comparación con la fijación de IL6R-B3/IL6R-L (que se define como 1), desde IL6R-BP495/IL6R-L a IL6R-BP489/IL6R-L, respectivamente. Por lo tanto, se puede decir que estas variantes son superiores a la tecnología existente con respecto tanto a la selectividad como la fijación al FcγRIIb.

Aquí, las variantes relacionadas con IL6R-BP567/IL6R-L que se considera que son lo mejor en términos de selectividad por el FcγRIIb se estudiaron desde la perspectiva de la inmunogenia. Se ha introducido la alteración Y296D en el IL6R-BP567/IL6R-L, que mostraba la selectividad más alta, y en el IL6R-BP493/IL6R-L, que mostraba una fijación al FcγRIIaR que es completamente equivalente a la de la forma nativa y que mostraba un realce de 147 veces con respecto a la fijación al FcγRIIb. Se ha descrito la inclusión de Y296 en una secuencia deTregítopo (De Groot et al., *Blood* (2008) 112, 3303-3311), y la introducción de las alteraciones en este sitio pueden conducir a la pérdida de la función inmunosupresora que suele tener una IgG1 nativa. Por lo tanto, desde la perspectiva de la inmunogenia, las más preferidas son las variantes que no incluyen la alteración Y296D. Se produjeron IL6R-BP568/IL6R-L e IL6R-BP492/IL6R-L mediante la retirada de la alteración Y296D de IL6R-BP567/IL6R-L e IL6R-BP493/IL6R-L, respectivamente. Al tener en cuenta la selectividad y la actividad de fijación al FcγRIIb, la retirada de la alteración Y296D de IL6R-BP492/IL6R-L y de IL6R-BP568/IL6R-L disminuyó la selectividad y la actividad de fijación en comparación con cuando la Y296D estaba incluida. Sin embargo, en comparación con la forma nativa, la fijación al FcγRIIaR es de 1.6 veces y la fijación al FcγRIIb es de 211 veces para IL6R-BP568/IL6R-L, y la fijación al FcγRIIaR es de 1.2 veces y la fijación al FcγRIIb es de 131 veces para IL6R-BP492/IL6R-L y, por lo tanto, se seguían manteniendo las elevadas selectividad y actividad de fijación. Estos resultados permiten decir que IL6R-BP568/IL6R-L e IL6R-BP492/IL6R-L son variantes excelentes no solo en términos de selectividad y actividad de fijación al FcγRIIb, sino también en términos de inmunogenia.

[Ejemplo 9] Realce de la fijación al FcγRIIb mediante un anticuerpo heterodimerizado.

9-1. Evaluación de la introducción de P238D solo en una de las cadenas

Tal y como se muestra en la figura 26 del ejemplo 7 de referencia, la razón por la que la Fc(P238D) adquirió una alta fijación al FcγRIIb es por la introducción de la alteración P238D, porque la región que había formado un núcleo hidrófobo con los restos circundantes en el caso de la Pro ya no podía existir en el núcleo hidrófobo tras el cambio a Asp y se dirigía al lado del solvente, lo que dio lugar al gran cambio en la estructura del lazo del dominio A. Sin embargo, aún se tiene que verificar si es necesario introducir la alteración P238D en ambas cadenas o si resulta aceptable introducir P238D en una de las cadenas e introducir otras alteraciones en la otra cadena. De acuerdo con esto, para esta verificación se utilizaron los anticuerpos heterodimerizados con diferentes alteraciones introducidas en cada una de las cadenas H del anticuerpo.

La región variable (SEQ ID n.º 15) de un anticuerpo contra el glipicano 3 que comprende las CDR de GpH7 que es un anticuerpo antiglipicano 3 con mejora de la cinética en el plasma que se describe en la solicitud de patente internacional WO 2009/041062 se utilizó como la cadena H del anticuerpo. Se utilizaron GpH7-A5 (SEQ ID n.º 35) producido mediante la introducción de las alteraciones D356K y H435R en GpH7-G1d (SEQ ID n.º 34) en la que Gly y Lys se retiran del extremo carboxilo de IgG1 que lleva GpH7 como la región variable, y GpH7-B3 (SEQ ID n.º 17) producido al introducir la alteración K439E en GpH7-G1d. Las alteraciones D356K y K439E introducidas en las correspondientes cadenas H se introdujeron para formar de manera eficaz los heterodímeros para cada cadena H cuando se produjeron anticuerpos heterodimerizados que comprendían dos cadenas de H (solicitud de patente internacional WO 2006/106905). H435R es una alteración que inhibe la fijación a la proteína A y se introdujo para separar con eficacia el heterómero dimérico que comprende dos cadenas H cada una con diferentes alteraciones del homómero dimérico que comprende dos cadenas H cada una con las mismas alteraciones. Las variantes en las que los aminoácidos de las posiciones 236, 237 y 238 (numeración EU) en GpH7-B3 (SEQ ID n.º 17) producidas en el ejemplo 1 de referencia se sustituyeron por los aminoácidos originales y Cys se utilizaron como una de las cadenas H. El GpH7-AP001 producido al introducir P238D en GpH7-A5 (SEQ ID n.º 35) se utilizó como la otra cadena. GpL16-k0 (SEQ ID n.º 16) del anticuerpo contra el glipicano 3 con mejora de la cinética plasmática descrita en la solicitud de patente internacional WO 2009/041062 se utilizó como la cadena L común del anticuerpo. Estas variantes se expresaron y purificaron de acuerdo con el método del ejemplo 1 de referencia, y la fijación a cada uno de FcγRIIa de tipo R y FcγRIIb se valoró con el método del ejemplo 2 de referencia. La magnitud de la fijación al FcγR que presenta cada variante se muestra en la figura 15.

Las alteraciones G237W, G237F, G236N, P238G, P238N, P238E y P238D que se muestran en la figura 15 se refieren a las alteraciones introducidas en GpH7-B3. A5/B3 se refiere a GpH7-A5/GpH7-B3/GpL16-k0 sin que se haya introducido ninguna alteración en ninguna de las cadenas, y una variante que contiene P238D en solo una de las cadenas se refiere a GpH7-A5/GpH7-BF648/GpL16-k0. Sus resultados se muestran en la Tabla 9.

[Tabla 9]

NOMBRE DE LA VARIANTE	ALTERACIÓN INTRODUCIDA EN GpH7-A5	ALTERACIÓN INTRODUCIDA EN GpH7-B3	MAGNITUD DE LA FIJACIÓN DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO AL FcγRIIaR CUANDO LA DE GpH7-AP001/GpH7-BF-648 SE DEFINE COMO 100	MAGNITUD DE LA FIJACIÓN DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO AL FcγRIIb CUANDO LA DE GpH7-AP001/GpH7-BF-648 SE DEFINE COMO 100	MAGNITUD DE LA FIJACIÓN AL FcγRIIb/MAGNITUD DE LA FIJACIÓN AL FcγRIIaR
GpH7-G1d/GpL16-k0	*	*	515	65	0.5
GpH7-A5/GpH7-B3/GpL16-k0			570	77	0.5
GpH7-A5/GpH7-BF648/GpL16-k0		P238D	677	131	0.8
GpH7-AP001/GpH7-BF648/GpL16-k0	P238D	P238D	100	100	4.0
GpH7-AP001/GpH7-BF032/GpL16-k0	P238D	G236N	538	129	1.0
GpH7-AP001/GpH7-BP044/GpL16-k0	P238D	G237F	609	127	0.8
GpH7-AP001/GpH7-BP057/GpL16-k0	P238D	G237W	561	121	0.9
GpH7-AP001/GpH7-BP061/GpL16-k0	P238D	P238E	111	80	2.9
GpH7-AP001/GpH7-BP063/GpL16-k0	P238D	P238G	161	69	1.7
GpH7-AP001/GpH7-BP069/GpL16-k0	P238D	P238N	131	72	2.2

En la tabla 9, «magnitud de la fijación al FcγRIIb/magnitud de la fijación al FcγRIIaR» son valores obtenidos al dividir la magnitud de la fijación al FcγRIIb de cada variante entre la magnitud de la fijación al FcγRIIaR de cada variante, y demuestra que cuanto mayor es el valor, mayor es la selectividad por el FcγRIIb. Por otra parte, aunque las frases «alteración introducida en GpH7-A5» y «alteración introducida en GpH7-B3» indican las alteraciones introducidas en GpH7-A5 y GpH7-B3, respectivamente; y GpH7-G1d que se utilizó como molde cuando se produjeron GpH7-A5 y GpH7-B3 se indica mediante un asterisco (*). A partir de los resultados de la tabla 9, GpH7-AP001/GpH7-BF648/GpL16-k0 que tiene la alteración P238D en ambas cadenas tenía la mayor selectividad por el FcγRIIb. GpH7-AP001/GpH7-BP061/GpL16-k0, GpH7-AP001/GpH7-BP069/GpL16-k0 y GpH7-AP001/GpH7-BP063/GpL16-k0 que tienen P238E, P238N y P238G en la otra cadena muestran los valores de «magnitud de la fijación al FcγRIIb/magnitud de la fijación al FcγRIIaR» que son 2.9, 2.2 y 1.7, respectivamente, e incluso cuando se compara con GpH7-AP001/GpH7-BF648/GpL16-k0 que tiene la alteración P238D en ambas cadenas, se mantiene la alta selectividad por el FcγRIIb. Por otra parte, ya que GpH7-AP001/GpH7-BF648/GpL16-k0 que tiene la alteración P238D en ambas cadenas también retuvo el 69% o más de afinidad por el FcγRIIb, se puede decir que si la alteración P238D está presente en una de las cadenas, la otra cadena puede tener la alteración P238E, P238N o P238G. Además, centrándonos en la fijación al FcγRIIb, en comparación con GpH7-AP001/GpH7-BF648/GpL16-k0 que tiene P238D en ambas cadenas, GpH7-A5/GpH7-BF648/GpL16-k0 que tiene P238D solo en una de las cadenas y no tiene ninguna alteración en la otra cadena mostraba una fijación más fuerte al FcγRIIb; y GpH7-AP001/GpH7-BP032/GpL16-k0, GpH7-AP001/GpH7-BP044/GpL16-k0 y GpH7-AP001/GpH7-BP057/GpL16-k0 que tienen P238D en una de sus cadenas y tienen G236N, G237F y G237W, respectivamente, en la otra cadena se halló que se fijaban con más fuerza al FcγRIIb.

9-2. Verificación de las alteraciones en función de la información estructural de Fc(P208)/FcγRIIb

Tal y como se muestra en la figura 10, en la estructura del cristal de Fc(P208)/FcγRIIb, no se observó la densidad electrónica de la Lys de la posición 117 del FcγRIIb y se consideró que este resto no estaba en buena parte implicado en la fijación con Fc(P208); pero al sustituir el Asp o el Glu por Ser en la posición 239 (numeración EU) del dominio B de CH2, que está colocado muy cerca, se puede formar una interacción electrostática con esta Lys de la posición 117 del FcγRIIb. Por otra parte, tal y como se muestra en la figura 7, en el dominio A de CH2, la Ser de la posición 239 (numeración EU) forma un puente de hidrógeno con la Gly de la posición 236 (numeración EU) y la estabilización de la estructura de lazo desde las posiciones 233 a 239 (numeración EU) puede contribuir a fortalecer la fijación con la Tyr de la posición 160 (numeración EU), y se predice que las sustituciones en esta porción causan la disminución en la actividad de fijación que acompaña a la desestabilización de la estructura del lazo en el dominio A de CH2, y estos efectos se predijo que se cancelan entre sí en las alteraciones homólogas. De acuerdo con esto, en esta evaluación, la alteración S239D o la alteración S239E se introdujo solo en una de las cadenas mediante heterodimerización, y se evaluaron los efectos sobre la mejora de la fijación al FcγRIIb.

Al igual que una de las cadenas de H del anticuerpo, el IL6R-BP256 y el IL6R-BP257 se produjeron al introducir S239D y S239E, respectivamente, en el IL6R-BP208 (SEQ ID n.º 24). De igual forma, se introdujo S239D en el IL6R-BP230 (SEQ ID n.º 27) para producir IL6R-BP259 y se introdujo S239E en el IL6R-BP230 para producir IL6R-BP260. Se produjo el IL6R-AP002 al introducir las mismas alteraciones que las incluidas en el CH2 de IL6R-BP208, que son E233D, G237D, P238D, H268D, P271G y A330R, en el IL6R-A5 (SEQ ID n.º 69), y se produjo el IL6R-AP009 al introducir las mismas alteraciones que las incluidas en el CH2 de IL6R-BP230, que son E233D, G237D, P238D, H268D, P271G, Y296D y A330R, en el IL6R-A5, y se utilizaron como la otra cadena H del anticuerpo. Para comparar, el IL6R-BP253 (SEQ ID n.º 32) se produjo al introducir S267E y L328F, que es una técnica de realce por FcγRIIb conocida (documento 28 que no es patente) en el IL6R-B3. El IL6R-L (SEQ ID n.º 21) se utilizó como la cadena L común del anticuerpo. Los anticuerpos se expresaron utilizando estas variantes y, a continuación, se purificaron de acuerdo con el método del ejemplo 1 de referencia, y la fijación a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIa de tipo H, FcγRIIa de tipo R, FcγRIIb y FcγRIIIa de tipo V) se valoró mediante el método del ejemplo 2 de referencia.

Los valores de KD de cada variante para cada FcγR se muestran en la tabla 10. «KD(IIb) del polipéptido original/KD(IIb) del polipéptido alterado» se refiere a un valor obtenido al dividir el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para el FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para el FcγRIIb. Por otra parte, «KD(IIaR) del polipéptido original/KD(IIaR) del polipéptido alterado» se refiere a un valor obtenido al dividir el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para el FcγRIIaR entre el valor de KD de cada variante para el FcγRIIaR. «KD(IIaR)/KD(IIb)» es un valor obtenido al dividir la KD de cada variante para el FcγRIIaR entre la KD de cada variante para el FcγRIIb. Cuanto más grande es este valor, mayor es la selectividad por el FcγRIIb. En la tabla 10, las celdas rellenas de gris muestran los valores calculados mediante la ecuación siguiente

[Ecuación 2]

$$KD = C \bullet R_{máx}/(R_{eq} - RI) - C$$

mostrada en el ejemplo 2 de referencia, ya que la fijación del FcγR a la IgG era demasiado débil para analizarla con exactitud mediante el análisis cinético.

[Tabla 10]

NOMBRE DE LA VARIANTE	KD PARA FcγRIa (mol/l)	KD PARA FcγRIIaR (mol/l)	KD PARA FcγRIIaH (mol/l)	KD PARA FcγRIIb (mol/l)	KD PARA FcγRIIIaV (mol/l)	KD(IIaR)/KD(IIb)	KD(IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/KD(IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO	KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO
IL6R-G1d/IL6R-L	3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	1.1	1
IL6R-B3/IL6R-L	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0 3	1.0	1
IL6R-BP253/IL6R-L	5.0E-11	2.3E-09	8.6E-07	8.9E-09	4.0E-07	0.3	480.0	349
IL6R-BP208/IL6R-L	1.9E-08	8.5E-07	8.3E-06	3.2E-08	5.3E-05	26.3	1.3	95
IL6R-BP256/IL6R-L	2.0E-09	7.3E-07	2.1E-05	8.7E-08	1.1E-05	8.4	1.5	36
IL6R-BP257/IL6R-L	3.1E-10	1.3E-06	3.9E-05	4.3E-07	1.9E-05	3.0	0.9	7
IL6R-AP002/IL6R-BP256/IL6R-L	3.6E-09	1.4E-07	4.2E-06	4.1E-09	1.7E-05;	34.3	7.7	752
IL6R-AP002/IL6R-BP257/IL6R-L	1.9E-09	1.3E-07	4.9E-06	4.7E-09	1.4E-05	27.7	8.3	657
IL6R-BP230/IL6R-L	1.4E-08	5.7E-07	9.6E-06	2.1E-08	6.7E-05	27.5	1.9	149
IL6R-BP259/IL6R-L	3.1E-09	8.6E-07	1.8E-05	1.1E-07	1.1E-05	8.0	1.3	29
IL6R-BP260/IL6R-L	3.1E-10	1.2E-06	3.9E-05	3.8E-07	2.1E-05	3.2	0.9	8
IL6R-AP009/IL6R-BP259/IL6R-L	3.5E-09	1.9E-07	6.6E-06	3.9E-09	2.2E-05	47.7	5.8	788
IL6R-AP009/IL6R-BP260/IL6R-L	1.7E-09	1.4E-07	5.4E-06	4.2E-09	1.6E-05	34.2	7.6	739

Tal y como se muestra en la tabla 10, en comparación con IL6R-BP208/IL6R-L, tanto IL6R-AP002/IL6R-BP256/IL6R-L como IL6R-AP002/IL6R-BP257/IL6R-L que se produjeron mediante la introducción de S239D y S239E, respectivamente, en una de las cadenas de IL6R-BP208/IL6R-L mostraban realzada la fijación al FcγRIIb. Por otra parte, el valor de KD(IIaR)/KD(IIb) era mayor que el de IL6R-BP256/IL6R-L y también mejoró la selectividad por el FcγRIIb. Por otra parte, en comparación con el IL6R-BP208/IL6R-L, tanto la selectividad como la fijación al FcγRIIb que presenta el IL6R-BP256/IL6R-L producido al introducir S239D en ambas cadenas de IL6R-BP208/IL6R-L e IL6R-BP257/IL6R-L producidos al introducir S239E en ambas cadenas de IL6R-BP208/IL6R-L, habían disminuido significativamente. De este modo, cuando se introdujo S239D o S239E solo en una de las cadenas, se observaron los efectos de realce de la fijación al FcγRIIb, mientras que cuando se introdujo S239D o S239E en ambas cadenas, la fijación al FcγRIIb disminuyó significativamente. La principal razón por la que ocurría esto puede ser, tal y como se describió anteriormente, la desestabilización de la estructura del lazo en el dominio A de CH2. Se observaron resultados similares cuando se introdujo S239D y S239E con el uso de IL6R-BP230/IL6R-L como molde. El IL6R-AP009/IL6R-BP259/IL6R-L y el IL6R-AP009/IL6R-BP260/IL6R-L producidos al introducir S239D y S239E, respectivamente, en una de las cadenas de IL6R-BP230/IL6R-L mostraban mayor selectividad y mayor fijación al FcγRIIb que las de IL6R-BP230/IL6R-L. Por otra parte, el IL6R-BP259/IL6R-L y el IL6R-BP260/IL6R-L producidos al introducir S239D y S239E, respectivamente, en ambas cadenas mostraban una disminución enorme de la selectividad y de la fijación al FcγRIIb en comparación con las de IL6R-BP230/IL6R-L. Por otra parte, las variantes producidas al introducir S239D o S239E en una de las cadenas de IL6R-BP208/IL6R-L e IL6R-BP230/IL6R-L mostraban todas una mayor selectividad, así como mayor fijación al FcγRIIb en comparación con las de IL6R-BP253/IL6R-L mediante el uso de una técnica de realce de FcγRIIb conocida.

9-3. Verificación de las alteraciones en función de la información estructural sobre Fc(P208)/FcγRIIaR

La comparación de las estructuras del cristal de Fc(P208) con FcγRIIb y con FcγRIIaR en el ejemplo 3 mostró que hay una diferencia en la densidad electrónica en torno a la posición 237 (numeración EU) donde se forma un puente de hidrógeno con la Tyr de la posición 160 del FcγRIIb y se sugirió que el lado del dominio A de CH2 tiene una mayor contribución a la fijación con el FcγRII y se sugirió que el lado del dominio B de CH2 tiene una mayor contribución a la fijación con el FcγRIIaR (figuras 12 y 13). Por ejemplo, a partir del aspecto de la densidad de potencial, en la fijación con el FcγRIIa de tipo R, la Leu de la posición 234 y la Leu de la posición 235 (numeración EU) en el dominio B de CH2 se considera que están implicadas en la fijación al receptor, mientras que estos restos pueden tener solo una pequeña implicación en la fijación al FcγRIIb. A continuación, al sustituir estos dos restos por restos diferentes que no sean restos hidrófobos, se puede reducir aún más la interacción con el FcγRIIa de tipo R. Sin embargo, en el lado del dominio A de CH2, los restos de la Leu de la posición 234 y de la Leu de la posición 235 (numeración EU) se considera que contribuyen a la estabilización de la estructura del lazo en torno a la posición 237 (numeración EU) y, en particular, es muy probable que estén mucho más implicados en la fijación al FcγRIIb. Por lo tanto, la

sustitución de estos restos por restos diferentes que no sean restos hidrófobos puede hacer disminuir la interacción del dominio A de CH2 con el FcγRIIb. En particular, la Leu de la posición 235 (numeración EU) forma una interacción hidrófoba favorable en el dominio A del CH2 de una estructura del complejo formado con el FcγRIIb y, ya que se considera que contribuye mucho a la estabilización de la estructura del lazo en torno a la posición 237 (numeración EU), se evaluó este resto mediante la sustitución de un resto solo en una de las cadenas por un resto no hidrófobo. Si la interacción hidrófoba en el dominio A de CH2 en particular se puede además fortalecer para estabilizar adicionalmente la estructura del lazo en torno a la posición 237 (numeración EU) mediante la sustitución de la Leu de la posición 235 (numeración EU) por los aminoácidos hidrófobos diferentes a Leu en ambas cadenas, esto puede conducir a la reducción de la pérdida de la energía entrópica que acompaña a la formación del puente de hidrógeno con la Tyr de la posición 160 del FcγRIIb y puede ocasionar el realce de la selectividad y de la fijación al FcγRIIb; por lo tanto, estas se evaluaron también.

Como cadena H del anticuerpo, se produjo el IL6R-BP264 (SEQ ID n.º 28) por la introducción de E233D, G237D, P238D, H268E, P271G, Y296D y A330R en el IL6R-B3 (SEQ ID n.º 23) que se utilizó como molde. Se produjeron variantes en las que la Leu de la posición 234 (numeración EU) del IL6R-BP264 se sustituyó individualmente por Asn, Ser, Asp, Gln, Glu, Thr, Arg, His, Gly, Lys y Tyr. También se produjeron variantes en las que el aminoácido de la posición 235 (numeración EU) en el IL6R-BP264 se sustituyó por cualquiera de los 18 aminoácidos diferentes al aminoácido original y Cys. Para la otra cadena H del anticuerpo, se produjo eñ IL6R-AP029 (SEQ ID n.º 42) por la introducción de E233D, G237D, P238D, H268E, P271G, Y296D y A330R en el IL6R-A5 (SEQ ID n.º 69). El IL6R-L (SEQ ID n.º 21) se utilizó como la cadena L común del anticuerpo. Las variantes producidas por la introducción de L234N, L234S, L234D, L234Q, L234E, L234T, L234R, L234H, L234G, L234K y L234Y en el IL6R-BP264, y las variantes producidas por la introducción de L235W, L235M, L235P, L235F, L235A, L235V y L235I, respectivamente, en el IL6R-BP264 se prepararon como anticuerpos homólogos que contienen la misma alteración en ambas cadenas y variantes producidas por la introducción de L235N, L235S, L235D, L235Q, L235E, L235T, L235R, L235H, L235G, L235K y L235Y, respectivamente, se combinaron con el IL6R-AP029 para preparar anticuerpos heterodiméricos y estos a continuación se evaluaron.

Estas variantes se utilizaron para la expresión y purificación del anticuerpo de acuerdo con el método del ejemplo 1 de referencia, y la fijación a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIa de tipo H, FcγRIIa de tipo R, FcγRIIb, y FcγRIIIa de tipo V) se valoró con el método del ejemplo 2 de referencia. En la figura 16 se muestra un gráfico en el que los valores de la KD de cada variante para el FcγRIIb se muestran en el eje horizontal y los valores de la KD de cada variante para el FcγRIIaR se muestran en el eje vertical.

Tal y como se muestra en la figura 16, el IL6R-BP404/IL6R-L producido por la introducción de L234Y en ambas cadenas de IL6R-BP264/IL6R-L mostraba un ligero realce de la fijación al FcγRIIb en comparación con la de IL6R-BP264/IL6R-L antes de la alteración.

De entre estas variantes, el IL6R-BP404/IL6R-L con realce de la fijación al FcγRIIb y las variantes con realce de la selectividad por el FcγRIIb se resumen en la tabla 11. En esta tabla, «KD(IIb) del polipéptido original/KD(IIb) del polipéptido alterado» se refiere a un valor obtenido al dividir el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para el FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para el FcγRIIb. «KD(IIaR) del polipéptido original/KD(IIaR) del polipéptido alterado» se refiere a un valor obtenido al dividir el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para el FcγRIIaR entre el valor de KD de cada variante para el FcγRIIaR. «KD(IIaR)/KD(IIb)» es un valor obtenido al dividir la KD de cada variante para el FcγRIIaR entre la KD de cada variante para el FcγRIIb. Cuanto más grande es este valor, mayor es la selectividad por el FcγRIIb. En la tabla 11, las celdas con relleno gris muestran los valores calculados mediante la ecuación siguiente

[Ecuación 2]

$$KD = C \bullet R_{máx}/(R_{eq} - RI) - C$$

mostrada en el ejemplo 2 de referencia, ya que la fijación del FcγR a la IgG era demasiado débil para analizarla con exactitud mediante el análisis cinético.

[Tabla 11]

NOMBRE DE LA VARIANTE	KD PARA FcγRIa (mol/l)	KD PARA FcγRIIaR (mol/l)	KD PARA FcγRIIaH (mol/l)	KD PARA FcγRIIb (mol/l)	KD PARA FcγRIIIaV (mol/l)	KD(IIaR)/KD (IIb)	KD(IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/KD(IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO	KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO
IL6R-G1d/IL6R-L	3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-B3/IL6R-L	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	1.0	1.0
IL6R-BP264/IL6R-L	7.4E-09	3.5E-07	2.8E-06	1.2E-08	2.6E-05	28.3	3.2	252.0
IL6R-BP404/IL6R-L	1.0E-08	3.6E-07	3.4E-06	1.1E-08	3.3E-05	32.1	3.1	276.8
IL6R-BP408/IL6R-L	1.4E-07	3.4E-05	7.7E-05	7.2E-07	5.0E-05	47.0	0.03	4.3
IL6R-BP419/IL6R-L	4.0E-08	8.3E-07	3.8E-05	2.6E-08	3.8E-05	32.0	1.3	118.8
IL6R-AP029/IL6R-BP407/IL6R-L	1.3E-08	6.3E-07	8.9E-06	1.9E-08	2.3E-05	33.5	1.7	164.0
IL6R-AP029/IL6R-BP408/IL6R-L	2.0E-08	8.6E-07	8.2E-06	2.6E-08	3.1E-05	33.6	1.3	121.1
IL6R-AP029/IL6R-BP409/IL6R-L	1.9E-08	6.3E-07	9.4E-08	1.5E-08	2.8E-05	40.8	1.8	201.3
IL6R-AP029/IL6R-BP410/IL6R-L	1.7E-08	6.6E-07	5.1E-06	2.2E-08	2.1E-05	29.7	1.7	139.0

Tal y como se muestra en la tabla 11, el IL6R-BP404/IL6R-L producido por la introducción de L234Y en ambas cadenas de IL6R-BP264/IL6R-L mostraba un incremento de 1.1 veces de la fijación al FcγRIIb en comparación con la de IL6R-BP264/IL6R-L antes introducir las alteraciones. El IL6R-BP408/IL6R-L producido por la introducción de L235Q en ambas cadenas de IL6R-BP264/IL6R-L, el IL6R-BP419/IL6R-L producido por la introducción de L235F en ambas cadenas de IL6R-BP264/IL6R-L, el IL6R-AP029/IL6R-BP407/IL6R-L producido por la introducción de L235D en una de las cadenas de IL6R-BP264/IL6R-L, el IL6R-AP029/IL6R-BP408/IL6R-L producido por la introducción de L235Q en una de las cadenas de IL6R-BP264/IL6R-L, el IL6R-AP029/IL6R-BP409/IL6R-L producido por la introducción de L235E en una de las cadenas de IL6R-BP264/IL6R-L y el IL6R-AP029/IL6R-BP410/IL6R-L producido por la introducción de L235T en una de las cadenas de IL6R-BP264/IL6R-L mostraban todas valores de KD(IIaR)/KD(IIb) que eran mayores que los de IL6R-BP264/IL6R-L antes de introducir la alteración, y pueden ser variantes con mejora de la selectividad por el FcγRIIb.

[Ejemplo 10] Valoración de la inmunogenia de las variantes de Fc con realce de la fijación al FcγRIIb mediante el uso de la herramienta *in silico* de predicción de la inmunogenia

Cuando se utilizan las variantes de Fc descritas en este ejemplo como anticuerpos terapéuticos, se prefiere que no se induzca la producción de los anticuerpos antifármaco que debilitan su efecto farmacológico. Ya que los anticuerpos con una alta inmunogenia tienden a inducir la producción de anticuerpos contra el fármaco, es preferible que la inmunogenia de los anticuerpos terapéuticos sea tan baja como sea posible. Los intentos por evitar el incremento de la inmunogenia de las variantes lo máximo posible pasan por utilizar herramientas *in silico* de predicción de la inmunogenia que predicen los epítopos de los linfocitos T, tales como Epibase y EpiMatrix. Epibase Light (Lonza) es una herramienta *in silico* de predicción de la inmunogenia para calcular la capacidad de fijación del péptido de nonamérico al CMH de clase II que contiene los alelos DRB1 principales mediante el algoritmo FASTER (*Expert Opin Biol Ther*. de marzo de 2007; 7(3): 405-18). Esta herramienta puede identificar los epítopos de linfocitos T con fuerte fijación (epítopos fuertes) y con fijación media (epítopos medios) al CMH de clase II.

La frecuencia poblacional del alotipo DRB1 queda reflejado en el cálculo y, para esto, se puede utilizar la frecuencia de la población caucasiana que se muestra en la tabla 12 que viene a continuación.

[Tabla 12]

DRB1*1501	24.5%
DRB1*0301	23.7%
DRB1*0701	23.3%
DRB1*0401	16.2%
DRB1*0101	15.0%
DRB1*1101	11.6%
DRB1*1301	10.9%
DRB1*1302	8.2%
DRB1*0404	5.9%
DRB1*1104	5.8%
DRB1*1601	5.0%
DRB1*1401/1454	4.9%
DRB1*0801	4.9%

DRB1*0102	3.8%
DRB1*1201/1206/1210	3.3%
DRB1*0407	2.7%
DRB1*0901	2.3%
DRB1*1303	2.0%
DRB1*1001	1.9%
DRB1*0405	1.5%
DRB1*0403	1.0%
DRB1*1102	0.7%
DRB1*0802	0.7%
DRB1*1502	0.5%
DRB1*0804	0.4%
DRB1*1404	0.4%
DRB1*0803	0.3%
DRB1*0406	0.2%
DRB1*1402	0.2%
DRB1*1602	0.2%
DRB1*1202	0.1%
DRB1*0304	0.1% O MENOS
DRB1*1405	0.1% O MENOS
DRB1*0410	0.1% O MENOS
DRB1*1503	0.1% O MENOS
DRB1*1106	0.1% O MENOS
DRB1*1504	0.1% O MENOS
DRB1*1304	0.1% O MENOS
DRB1*1110	0.1% O MENOS
DRB1*1406	0.1% O MENOS
DRB1*0411	0.1% O MENOS
DRB1*0302	0.1% O MENOS
DRB1*1312	0.1% O MENOS

Esta herramienta se utilizó para comparar el número total de epítopos de linfocitos T con fijación fuerte y fijación media que están incluidos en las secuencias (la secuencia desde la posición 118 al extremo carboxilo (numeración EU)) de diferentes variantes de Fc descritas hasta la fecha y variantes de Fc con realce de la selectividad de fijación por el FcγRIIb descritas en el ejemplo. Específicamente, se produjeron los siguientes anticuerpos como controles de comparación para evaluar las técnicas preexistentes: Fc(DLE) (SEQ ID n.º78) que es una región Fc de anticuerpo en la que se han introducido las alteraciones S239D, A330L e I332E, que se ha descrito anteriormente que realzan la fijación al FcγRIIIa (*Proc Natl Acad Sci USA*. 2006, 103:4005-10); Fc(YTE) (SEQ ID n.º 79) que es una región Fc de anticuerpo en la que se han introducido las alteraciones M252Y, S254T y T256E, que se ha descrito anteriormente que realzan la fijación al FcRn (*J Biol Chem.* 2006, 281:23514-24); Fc(EF) (SEQ ID n.º 80) que es una región Fc de anticuerpo en la que se han introducido las alteraciones S267E y L328F, que se ha descrito que realzan la fijación al FcγRIIb (*Mol Immunol*. 2008, 45: 3926-33); y Fc(P208) (SEQ ID n.º 81) que es una región Fc de un anticuerpo en la que se han introducido las alteraciones E233D, G237D, P238D, H268D, P271G y A330R, que se ha descrito que realzan la fijación al FcγRIIb y se describen en la solicitud de patente internacional WO 2012/115241. Por otra parte, se produjeron la Fc(P587) (SEQ ID n.º 70) que es una región Fc de anticuerpo en la que se han introducido las alteraciones E233D, P238D, S264I, S267A, H268E y P271G de una manera similar a la variante BP568 que mejora la fijación al FcγRIIb y que se describe en los ejemplos, y Fc(P588) (SEQ ID n.º 71) que es una región Fc de anticuerpo en la que se han introducido las alteraciones P238D, S264I, S267A, H268E, y P271G de una manera similar a BP492. El número total de epítopos de fijación fuerte y de fijación media en estas variantes de Fc se comparó con el uso de Epibase. Los resultados se muestran en la tabla 13.

[Tabla 13]

	NÚMERO DE epítopos de linfocitos T
Fc (DLE)	2
Fc (YTE)	5
Fc (EF)	4
Fc (P208)	5
Fc (P587)	2
Fc (P588)	2

Estos resultados indican que entre las variantes de Fc existentes, Fc(P587) y Fc(P588), que son regiones Fc de variantes descritas en los ejemplos, tienen un número pequeño de epítopos de linfocitos T y un riesgo bajo de inmunogenia. Al utilizar las variantes como fármaco, esta propiedad indica que disminuye la posibilidad de inducir anticuerpos contra el fármaco y que las variantes tienen propiedades excelentes.

[Ejemplo 11] Valoración de la cinética en la sangre de las variantes de Fc con realce de la fijación al FcγRIIb de humano mediante el uso de ratones transgénicos con el FcγRIIb de humano

(11-1) La valoración a grandes rasgos

Tal y como se indica en la solicitud de patente internacional WO 2013/047752, comparada con una IgG de humano nativa, la concentración plasmática de un antígeno destinatario soluble se puede reducir significativamente en un organismo vivo al administrar una molécula de fijación al antígeno que tiene actividad de fijación al FcRn de humano en condiciones de margen de pH ácido y que comprende un dominio de fijación al antígeno cuya actividad de fijación al antígeno de la molécula de fijación al antígeno cambia en función de la condición de fuerza iónica, y un dominio de fijación al FcγR con una actividad de fijación al FcγR más alta que el dominio de fijación al FcγR de una región Fc de IgG de humano nativa, en donde la cadena de polisacárido unida a la posición 297 (numeración EU) es una cadena de polisacárido que contiene fucosa. También se ha descrito que cuando se administra *in vivo* una molécula de fijación al antígeno que tiene realzada en particular la actividad de fijación al FcγRIIb entre los FcγR, se acelera la eliminación de antígenos solubles en el plasma y se puede reducir de manera eficaz la concentración de antígenos solubles en el plasma. En este ejemplo, una variante de Fc con realce de la fijación al FcγRIIb de humano se administró a ratones transgénicos genéticamente modificados en los que se había introducido el FcγRIIb de humano para analizar si la velocidad de eliminación de los antígenos solubles destinatarios puede acelerarse por la variante de Fc que tiene realmente realzada la fijación al FcγRIIb de humano descrito en la presente memoria.

(11-2) Preparación de anticuerpos con realce de la fijación al FcγRIIb

Los siguientes anticuerpos se utilizaron como las variantes de Fc con realce de la fijación al FcγRIIb de humano:

Se produjo IL6R-P587 mediante la introducción de las alteraciones E233D, P238D, S264I, S267A, H268E y P271G de una manera similar a BP568 en el IL6R-G1d (SEQ ID n.º 19) que consiste en una región constante de G1d en la que se han retirado las Gly y Lys del extremo carboxilo del IgG1 de humano y una región variable de un anticuerpo contra el receptor de la interleucina 6 de humano (IL-6R de humano) descrito en la solicitud de patente internacional WO 2009/125825. Fv4-P587 que comprende el IL6R-P587 como la cadena H del anticuerpo y el IL6R-L2 (SEQ ID n.º 74), que es la cadena L de un anticuerpo contra el IL-6R de humano descrito en la solicitud de patente internacional WO 2009/125825 como la cadena L del anticuerpo, se preparó de acuerdo con el método del ejemplo 1 de referencia. Como control para la comparación, Fv4-IgG1 que comprende el IL6R-G1d (SEQ ID n.º 19) y el IL6R-L2 (SEQ ID n.º 74) como la cadena H del anticuerpo y la cadena L del anticuerpo, respectivamente, se preparó de igual forma de acuerdo con el método del ejemplo 1 de referencia. Tal y como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2009/125825, Fv4-G1d y Fv4-P587 preparados en la presente memoria comprenden un dominio de fijación al antígeno cuya actividad de fijación al antígeno de la molécula de fijación al antígeno cambia en función de la fuerza iónica de los protones, es decir, la actividad de fijación al antígeno del dominio de fijación al antígeno se fija al IL-6R de humano (antígeno) en condiciones de pH ácido con menos fuerza que en condiciones de pH neutro.

(11-3) Producción de ratones transgénicos con el FcγRIIb de humano

Se produjeron ratones transgénicos con el FcγRIIb de humano por el método que viene a continuación.

Los ratones transgénicos se produjeron mediante la introducción del gen de FcγRIIb de humano en los ratones C57BL/6(B6). La producción de ratones transgénicos se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en Nagy et al., (*Manipulating the mouse embryo*, CSHL press. (2003) 399-506) y en Ueda et al. (*Latest Technology for Gene Targeting*, Yodosha, (2000) 190-207). Más específicamente, se produjeron ratones transgénicos mediante la microinyección en los huevos fertilizados pronucleares de ratones B6 un cromosoma artificial bacteriano en el que está clonada la región genómica del gen del FcγRIIb de humano (GeneBank n.º NW_004077999: 18,307, 411-18,381,603). Los ratones a los que se ha transferido el gen del FcγRIIb de humano se seleccionaron entre los ratones obtenidos mediante transferencia Southern gracias al uso de una sonda que se hibrida específicamente con el gen del FcγRIIb de humano y con la realización de una PCR. Se recogieron sangre e hígado de los ratones transgénicos con el FcγRIIb de humano y la expresión del gen del FcγRIIb de humano se confirmó mediante transcripción inversa acoplada a una reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) con el uso de cebadores que amplifican específicamente el gen del FcγRIIb de humano. Como resultado, se detectó la expresión del gen del FcγRIIb de humano. Por otra parte, se aislaron células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) de la sangre de los ratones transgénicos con el FcγRIIb de humano y se confirmó la expresión del FcγRIIb de humano en las CMSP mediante análisis de clasificación de células activadas fluorescentes (FACS).

Como resultado, se detectó la expresión del FcγRIIb de humano. Lo de más arriba confirmó que se habían consolidado los ratones transgénicos con el FcγRIIb de humano que expresan el FcγRIIb de humano.

(11-4) Análisis *in vivo* de la administración simultánea de antígenos y anticuerpos con el uso de ratones transgénicos con el FcγRIIb de humano

Con el uso de los ratones transgénicos con el FcγRIIb de humano en (11-3), se administraron de manera simultánea el IL-6R soluble de humano que es el antígeno y el anticuerpo contra el IL-6R de humano preparado en (11-2), y se evaluó la concentración plasmática del IL-6R de humano soluble y del anticuerpo contra el IL-6R de humano después de la administración.

Una solución mixta del IL-6R de humano soluble y el anticuerpo contra el IL-6R de humano (5 µg/ml y 0.1 mg/ml, respectivamente) se administró en una dosis única a 10 ml/kg en la vena de la cola. En este caso, ya que el anticuerpo contra el IL-6R de humano está presente en suficiente exceso con respecto al IL-6R de humano soluble, se consideró que casi todo el IL-6R de humano soluble estaba fijado al anticuerpo. Se recogió sangre a los 5 min, 1 h, 4 h, 7 h, 1 día, 3 días, 7 días, 14 días, 21 días y 28 días después de la administración. La sangre recogida se centrifugó inmediatamente a 4°C y 15 000 rpm durante 15 min para obtener el plasma. El plasma separado se conservó en un congelador ajustado a –20°C o a una temperatura inferior hasta el momento de la medición. Los Fv4-P587 y Fv4-IgG1 descritos más arriba se utilizaron para el anticuerpo contra el IL-6R de humano.

(11-5) Medición de la concentración por ELISA del anticuerpo contra el IL-6R de humano

La concentración del anticuerpo contra el IL-6R de humano en el plasma de ratón se midió por ELISA. Primero, el fragmento $F(ab')_2$ del anticuerpo (específico de la cadena γ) contra la IgG de humano (Sigma) se distribuyó en alícuotas en una placa Nunc-Immuno, MaxiSorp (Nalge Nunc International) y a continuación se dejó reposar durante una noche a 4°C para preparar una placa con el anti-IgG de humano inmovilizado. Se prepararon muestras para la curva de calibración de la concentración plasmática a 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 y 0.0125 µg/ml y las muestras del análisis del plasma de ratón se diluyeron a 100 veces o más. Las mezclas obtenidas al añadir 200 µl de IL-6R de humano soluble a 20 ng/ml a 100 µl de las muestras de la curva de calibración o las muestras del análisis del plasma se agitaron a continuación durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, la placa con el anti-IgG de humano inmovilizado en la que se habían dispensado las mezclas se agitó además durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se hizo reaccionar un anticuerpo biotinilado contra el IL-6R de humano (R&D) con las muestras a temperatura ambiente durante 1 h y se hizo reaccionar Streptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) con las muestras a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción cromógena se llevó a cabo con el sustrato para micropocillos TMB One Component HRP (BioFX Laboratories). Después de que la reacción se detuviera con la adición de ácido sulfúrico a 1 N (Showa Chemical), se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas. La concentración de los anticuerpos en el plasma de ratón se calculó a partir de los valores de absorbancia de la curva de calibración con el programa de análisis SOFTmax PRO (Molecular Devices). En la figura 33 se muestra la evolución de la concentración del anticuerpo con el tiempo en el plasma en los ratones transgénicos con el FcγRIIb de humano después de la administración intravenosa medida por este método.

(11-5) Medición de la concentración del anticuerpo contra el IL-6R de humano en el plasma mediante electroquimioluminiscencia

La concentración de IL-6R de humano en el plasma de ratón se midió mediante electroquimioluminiscencia. Se prepararon muestras para la curva de calibración de IL-6R de humano a concentraciones plasmáticas de 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.781, 0.391 y 0.195 ng/ml, y las muestras del análisis del plasma de ratón se prepararon mediante la dilución a 50 veces o más. Se mezclaron el anticuerpo monoclonal contra el IL-6R de humano (R&D) que se ha marcado con rutenio con el uso de SULFO-TAG NHS Ester (Meso Scale Discovery), el anticuerpo biotinilado contra el IL-6R de humano (R&D) y la solución de tocilizumab, y se dejaron reaccionar durante una noche a 37 °C. A continuación, la solución mezclada se distribuyó en alícuotas en la placa con Streptavidin Gold Multi-ARRAY (Meso Scale Discovery) sometida a bloqueo mediante el uso de una solución de TBS-Tween que contiene SAB al 0.5% (p/v) durante una noche a 5 °C. Se lavó la placa después de dejar que reaccionase durante 2 h más a temperatura ambiente. Inmediatamente después, el tampón de lectura T (x2) (Meso Scale Discovery) se distribuyó en alícuotas en la placa y las mediciones se llevaron a cabo con el SECTOR Imager 2400 (Meso Scale Discovery). Se calculó la concentración de hSIL-6R basándose en la respuesta de la curva de calibración mediante el programa analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). En la figura 34 se muestra la evolución de la concentración de IL-6R de humano soluble con el tiempo en el plasma de los ratones transgénicos con el FcγRIIb de humano después de la administración intravenosa, que se midió con este método.

(11-6) Efectos del realce de la fijación al FcγRIIb de humano

Los resultados del análisis *in vivo* se compararon para Fv4-P587 cuya fijación al FcγRIIb de humano ha mejorado y para Fv4-IgG1. Tal y como se muestra en la figura 33, la retención plasmática de ambos anticuerpos era casi la misma; sin embargo, tal y como se muestra en la figura 34, se confirmó que la

eliminación del IL-6R de humano se aceleraba cuando el IL-6R de humano se administraba de manera simultánea con Fv4-P587 que tiene realzada la fijación al FcγRIIb de humano en comparación con cuando se administraba el IL-6R de humano de manera simultánea con Fv4-IgG1. Más específicamente, un anticuerpo que se fija al IL-6R de humano de una manera dependiente del pH se encontró que era capaz de disminuir la concentración del IL-6R de humano soluble al realzar su capacidad de fijación al FcγRIIb de humano.

Sin desear comprometerse con ninguna teoría en particular, se debe considerar a partir de este resultado que, según el mecanismo indicado en la figura 35, los antígenos solubles en el plasma que se fijan a este anticuerpo desaparecen como resultado de su incorporación en las células que expresan el FcγRIIb a través del FcγRIIb de humano.

El IL-6R de humano soluble fijado a un anticuerpo que se fija al IL-6R de humano soluble se recicla en el plasma mediante el FcRn junto con el anticuerpo. En cambio, Fv4-IgG1, que es un anticuerpo que se fija al IL-6R de humano soluble de una manera dependiente del pH, se disocia del IL-6R de humano soluble fijado al anticuerpo en condiciones ácidas en el endosoma. Ya que el IL-6R de humano soluble disociado se degrada en el lisosoma, la eliminación del IL-6R de humano soluble se puede acelerar significativamente y Fv4-IgG1 que es un anticuerpo que se fija al IL-6R de humano soluble de manera dependiente del pH se fija al FcRn en el endosoma y a continuación se recicla en el plasma. Este anticuerpo reciclado se puede fijar de nuevo al IL-6R de humano soluble; por lo tanto, se repite la fijación al antígeno (IL-6R de humano soluble) y el reciclaje en el plasma por el FcRn. Se considera que, como resultado, una única molécula de anticuerpo puede repetir la fijación al IL-6R de humano soluble varias veces. Además, se considera que al realzar la actividad de fijación al FcγRIIb que presenta Fv4-IgG1, que muestra una fijación al antígeno dependiente del pH, en las células se incorpora rápidamente un complejo formado entre un anticuerpo que se fija al IL-6R de humano soluble y un IL-6R de humano soluble a través del FcγRIIb para posibilitar la disminución en la concentración del IL-6R de humano soluble de manera más eficaz (figura 35).

[Ejemplo 12] Evaluación de la cinética en la sangre de las variantes de Fc con realce de la fijación al FcγRIIb de humano con el uso de FcγRIIb de humano y ratones transgénicos con el FcRn de humano

(12-1) La valoración a grandes rasgos

Tal y como se indica en la solicitud de patente internacional WO 2013/047752, el uso de una molécula de fijación al antígeno que tiene una actividad de fijación al FcγR más alta que la de la región Fc de una IgG nativa y cuya actividad de fijación al FcRn de humano se mejora en una condición de margen de pH ácido confirmó que las propiedades de retención plasmática han mejorado en comparación con las moléculas de fijación al antígeno cuya actividad de fijación al FcRn de humano en condiciones de margen de pH ácido no está mejorada. Por otra parte, se han publicado resultados sobre una molécula de fijación a antígeno que tiene la actividad de fijación al FcγR más alta que la de la región Fc de la IgG de humano nativa y cuya actividad de fijación al FcRn de humano se realza en la condición de margen de pH ácido mostraba una disminución de la concentración plasmática del antígeno diana en comparación con la de una molécula de fijación al antígeno que tiene una actividad de fijación al FcγR más alta que la de la región Fc de la IgG de humano nativa y cuya actividad de fijación al FcRn de humano a pH ácido no se realza. De acuerdo con esto, se investigó si tienen propiedades similares las moléculas de fijación al antígeno que llevan variantes de la región Fc con realce de la fijación al FcγRIIb de humano descritas en los ejemplos.

(12-2) Producción de una molécula de fijación a antígeno cuya actividad de fijación al FcγR es más alta que la de una región Fc de IgG de humano nativa y cuya actividad de fijación al FcRn de humano se realza en las condiciones de margen de pH ácido

Además de Fv4-IgG1 y Fv4-P587 descritos en el ejemplo 11-2, se preparó el Fv4-P587-LS de acuerdo con el método del ejemplo 1 de referencia, en donde el Fv4-P587-LS contiene el IL6R-L2 como la cadena L del anticuerpo y el IL6R-P587-LS (SEQ ID n.º 73) como la cadena H del anticuerpo. Se produjo el IL6R-P587-LS mediante la introducción en el IL6R-P587, la cadena H de Fv4-P587, las alteraciones que consisten en una sustitución de la Met de la posición 428 por Leu y la sustitución de la Asn de la posición 434 por Ser, de acuerdo con la numeración EU, que son sustituciones que se ha descrito anteriormente que mejoran la cinética de los anticuerpos en la sangre (*Nat. Biotechnol*. 2010. 28; 157-159).

(12-3) Análisis de la interacción con el FcRn de humano

El análisis de la interacción entre un anticuerpo preparado y el FcRn de humano se realizó con un Biacore T200. Una cantidad apropiada de proteína L (BioVision) se inmovilizó sobre el chip sensor CM4 (GE Healthcare) mediante el método de acoplamiento a amina y se capturaron sobre esta los anticuerpos de interés. A continuación, un FcRn diluido y un tampón de funcionamiento (utilizado como solución de control) se inyectaron para permitir la interacción de los anticuerpos capturados sobre este chip sensor con el FcRn de humano. Se utilizó como tampón de funcionamiento fosfato de sodio a 50 mmol/l, NaCl a 150 mmol/l y Tween20 al 0.05% (p/v) (pH 6.0), y este tampón de funcionamiento se utilizó también para diluir el FcRn. Para la regeneración del chip se utilizó glicina-HCl a 10 mmol/l (pH 1.5). Todas las mediciones se realizaron a 25°C. Los parámetros cinéticos tales como la constante de la velocidad de asociación ka (1/Ms) y la

constante de la velocidad de disociación kd (1/s) se determinaron a partir del sensograma obtenido de las mediciones y se determinó la KD (M) de cada anticuerpo para el FcRn de humano a partir de los valores de estas constantes. Se utilizó el programa de evaluación del Biacore T200 (GE Healthcare) para calcular cada parámetro. Los valores de la KD de los anticuerpos preparados esta vez para el FcRn de humano que se midió mediante este método se muestran en la tabla 14. Tal y como se muestra en la tabla 14, en comparación con el Fv4-P587, se confirmó que el Fv4-P587-LS tiene realzada la fijación al FcRn en condiciones ácidas.

[Tabla 14]

	KD PARA EL FcRn DE HUMANO A pH 6.0 (μmol/l)
IgG1	1.4
P587	1.5
P587-LS	0.12

(12-4) Producción de ratones transgénicos con el FcγRIIb de humano y el FcRn de humano

Los ratones transgénicos con el FcγRIIb de humano y el FcRn de humano, y los ratones con el FcRn de ratón genosuprimido se produjeron mediante el método que se describe a continuación.

Primero, se produjeron ratones con genosupresión del FcRn de ratón. La producción de ratones genosuprimidos se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en Nagy et al., (*Manipulating the mouse embryo*, CSHL Press. (2003) 399-506). Más específicamente, se prepara un vector dirigido para destruir el gen del FcRn de ratón y se introduce en las células ES (procedentes de ratones C57BL/6) para destruir el gen del FcRn de ratón mediante recombinación homóloga. Se extrajo el ARN del hígado de los ratones consolidados con genosupresión de FcRn y mediante el uso de ADNc sintetizado de este ARN como un molde, se realizó la RT-PCR con los cebadores que amplifican específicamente el FcRn de ratón. Como resultado, no se detectó el gen del FcRn de ratón en los ratones con genosupresión del FcRn de ratón. A continuación, se produjeron ratones transgénicos mediante la introducción de los genes del FcγRIIb de humano y del FcRn de humano en los ratones con genosupresión del FcRn de ratón. Los ratones transgénicos se produjeron de acuerdo con los procedimientos descritos en Nagy et al., (*Manipulating the mouse embryo*, CSHL Press. (2003) 399-506) y en Ueda et al. (*Latest Technology for Gene Targeting*, Yodosha. (2000) 190-207). Más específicamente, los ratones se produjeron mediante la microinyección, en huevos fertilizados pronucleares de ratones con genosupresión del FcRn de ratón, de un cromosoma artificial bacteriano en el cual se habían clonado las regiones genómicas del gen del FcRn de humano (GeneBank #NC_000019.9:50 000,108-50 039 865) y del gen del FcγRIIb de humano (GeneBank # NW_004077999: 18,307, 411-18,381,603). Los ratones a los que se les introdujo el gen del FcRn de humano y el gen del FcγRIIb de humano, y que se hizo que fueran homocigotos para el alelo con genosupresión del FcRn de ratón, se seleccionaron de los ratones obtenidos mediante transferencia Southern con el uso de una sonda que se hibrida específicamente con cada gen y por PCR. Se recogió sangre de los ratones transgénicos con el FcγRIIb de humano y con el FcRn de humano, y de los ratones con genosupresión del FcRn de ratón, y se confirmó la expresión del gen del FcRn de humano y del gen del FcγRIIb de humano por RT-PCR con el uso de cebadores que amplifican de manera específica el gen del FcRn de humano y el gen del FcγRIIb de humano. Como resultado, se detectó la expresión del gen del FcRn de humano y del gen del FcγRIIb de humano. Lo de más arriba confirmó que se consolidaron los ratones transgénicos con el FcγRIIb de humano y con el FcRn de humano, y los ratones con genosupresión del FcRn de ratón que expresan el FcRn de humano y el FcγRIIb de humano, y que no expresan el FcRn de ratón.

(12-5) Mejora de la farmacocinética mediante el realce de la actividad de fijación al FcRn de humano en condiciones de margen de pH ácido

Se llevó a cabo la evaluación *in vivo* de una manera similar al método del ejemplo 11 mediante la administración de Fv4-IgG1, Fv4-P587 y Fv4-P587-LS por separado a ratones transgénicos con el FcγRIIb de humano y el FcRn de humano, y en cada grupo de ratones se midió la concentración plasmática del IL-6R soluble y del anticuerpo contra el IL-6R de humano. Los resultados de medir la concentración plasmática del anticuerpo contra el IL-6R de humano y el IL-6R soluble se muestran en la figura 36 y en la figura 37, respectivamente.

En el grupo de ratones a los que se les administró Fv4-P587-LS en el que la actividad de fijación de Fv4-P587 por el FcRn de humano en condiciones de margen de pH ácido había mejorado, se halló que la retención plasmática de los anticuerpos mejoraba en comparación con la del grupo de ratones que recibieron el Fv4-P587. Además, se muestra que el Fv4-P587-LS mejoraba la retención plasmática en comparación con el Fv4-IgG1. Por otra parte, la concentración plasmática del IL-6R soluble en el grupo de ratones a los que se les administró el Fv4-P587-LS era equivalente a la del grupo de ratones a los que se les administró el Fv4-P587. En el grupo de ratones a los que se les administró el Fv4-P587-LS o el Fv4-

P587, la concentración plasmática del IL-6R soluble disminuyó en comparación con el grupo de ratones a los que se les administró el Fv4-IgG1.

De acuerdo con esto, la administración del anticuerpo en el que ha mejorado la actividad de fijación al FcRn de humano de una molécula de fijación al antígeno en condiciones de margen de pH ácido, en la que la actividad de fijación al FcγRIIb de humano es más alta que la de una región Fc de IgG de humano nativa demostró que la retención plasmática de la molécula del antígeno administrado puede mejorar en un organismo vivo que recibe la administración. Por otra parte, incluso aunque la retención plasmática mejore en un organismo vivo al que se le ha administrado la molécula de fijación al antígeno, se demostró que no disminuía el efecto de eliminación del antígeno desde el organismo vivo, sino que más bien se mantenía.

Las alteraciones para realzar la actividad de fijación al FcRn de humano en condiciones de margen de pH ácido no tienen ninguna limitación particular; e incluyen: el método para sustituir Leu por Met en la posición 428 y Ser por Asn en la posición 434 (numeración EU) en un anticuerpo de tipo IgG (*Nat. Biotechnol*, (2010) 28, 157-159); el método para sustituir la Ala por Asn en la posición 434 (*Drug*. *Metab. Dispos*. (2010) 38 (4), 600-605); el método para sustituir Tyr por Met en la posición 252, Thr por Ser en la posición 254 y Glu por Thr en la posición 256 (*J. Biol. Chem*. (2006) 281, 23514-23524); el método para sustituir Gln por Thr en la posición 250 y Leu por Met en la posición 428 (*J. Immunol*. (2006) 176 (1) 346-356); el método para sustituir His por Asn en la posición 434 (*Clin. Pharm. & Ther*. (2011) 89 (2) 283-290.); y las alteraciones descritas en las solicitudes de patente internacional WO2010/106180, WO2010/045193, WO2009/058492, WO2008/022152, WO2006/050166, WO2006/053301, WO2006/031370, WO2005/123780, WO2005/047327, WO2005/037867, WO2004/035752, WO2002/060919 y similares.

[Ejemplo 1 de referencia] Construcción de vectores de expresión de anticuerpos; y expresión y purificación de anticuerpos

La síntesis de los genes completos que codifican la secuencia de nucleótidos de la cadena H y de la cadena L de la región variable del anticuerpo se realizó mediante los métodos de producción conocidos por los expertos en la técnica con el uso de Assemble PCR y similares. La introducción de las sustituciones de aminoácidos se llevó a cabo mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica por PCR o similares. El fragmento de plásmido obtenido se insertó en un vector de expresión de células animales y se produjeron el vector de expresión de la cadena H y el vector de expresión de la cadena L. La secuencia de nucleótidos del vector de expresión obtenido se determinó por los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los plásmidos producidos se introdujeron transitoriamente en la línea celular HEK293H procedente de células de cáncer de riñón embrionario de humano (Invitrogen) o en las células FreeStyle293 (Invitrogen) para la expresión del anticuerpo. Se recogió el sobrenadante del cultivo obtenido y, a continuación, se pasó a través de un filtro MILLEX(R)-GV de 0.22 µm (Millipore) o a través de un filtro MILLEX(R)-GV de 0.45 µm (Millipore) para obtener el sobrenadante del cultivo. Se purificaron los anticuerpos a partir del sobrenadante del cultivo obtenido mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica con el uso de rProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) o Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare). Para la concentración de los anticuerpos purificados, se les midió la absorbancia a 280 nm con un espectrofotómetro. A partir del valor obtenido, se utilizó el coeficiente de extinción calculado mediante los métodos, tales como PACE, para calcular la concentración del anticuerpo (*Protein Science* 1995; 4: 2411-2423).

[Ejemplo 2 de referencia] Método para preparar el FcγR y método para analizar la interacción entre un anticuerpo alterado y el FcγR

Se prepararon dominios extracelulares de los FcγR mediante el método que viene a continuación. Primero, un gen del dominio extracelular de FcγR se sintetizó mediante un método bien conocido por los expertos en la técnica. En ese momento, la secuencia de cada FcγR se produjo basándose en la información recogida en el NCBI. De manera específica, se produjo el FcγRI basándose en la secuencia del NCBI con n.º de acceso NM_000566.3, se produjo el FcγRIIa basándose en la secuencia del NCBI con n.º de acceso NM_001136219.1, se produjo el FcγRIIb basándose en la secuencia del NCBI con n.º de acceso NM_004001.3, se produjo el FcγRIIIa basándose en la secuencia del NCBI con n.º de acceso NM_001127593.1, y se produjo el FcγRIIIb basándose en la secuencia del NCBI con n.º de acceso NM_000570.3, y se le unió una etiqueta de His en el extremo carboxilo. Por otra parte, se conocen los polimorfismos para FcγRIIa, FcγRIIIa y FcγRIIIb, y se produjeron los sitios polimórficos según se referencia en *J. Exp. Med*., 1990, 172: 19-25 para FcγRIIa; *J. Clin. Invest*., 1997, 100 (5): 1059-1070 para FcγRIIIa; y *J. Clin. Invest*., 1989, 84, 1688-1691 para FcγRIIIb.

Los fragmentos génicos obtenidos se insertaron en un vector de expresión de células animales y se produjeron vectores de expresión. Los vectores de expresión producidos se introdujeron transitoriamente en las células FreeStyle293 (Invitrogen) procedentes de la línea de células de cáncer de riñón embrionario de humano para expresar las proteínas de interés. En referencia al FcγRIIb utilizado para el análisis cristalográfico, la proteína de interés se expresó en presencia de Kifunensine a una concentración final de 10 µg/ml, por lo que la cadena de polisacárido añadida al FcγRIIb será de tipo rica en manosa. Se cultivaron las células y después de recoger el sobrenadante del cultivo obtenido, este se pasó a través de un filtro de

0.22 µm para obtener el sobrenadante del cultivo. En principio, los sobrenadantes del cultivo obtenido se purificaron en las siguientes cuatro etapas. Las etapas llevadas a cabo fueron cromatografía en columna de intercambio de cationes (SP Sepharose FF) en la etapa 1, cromatografía en columna de afinidad (HisTrap HP) para la etiqueta de His en la etapa 2, cromatografía en columna de filtración en gel (Superdex200) en la etapa 3 y cromatografía aséptica en la etapa 4. Sin embargo, para el FcγRI se realizó la cromatografía en columna de intercambio aniónico con Q Sepharose FF como en la etapa 1. Las proteínas purificadas se sometieron a mediciones de absorbancia a 280 nm con un espectrofotómetro; y a partir de los valores obtenidos, la concentración de las proteínas purificadas se calculó con el coeficiente de absorción calculado con el uso de métodos tales como PACE (*Protein Science* 1995; 4: 2411-2423).

El análisis de la interacción entre cada anticuerpo alterado y el receptor de Fcγ preparado tal y como se mencionó más arriba se realizó con Biacore T100 (GE Healthcare), Biacore T200 (GE Healthcare), Biacore A100 y Biacore 4000. Se utilizó HBS-EP+ (GE Healthcare) como tampón de funcionamiento y la temperatura de la medición se ajustó a 25°C. Se utilizaron chips producidos por inmovilización del péptido antigénico, proteína A (Thermo Scientific), proteína A/G (Thermo Scientific) y proteína L (ACTIGEN o BioVision) mediante el método de acoplamiento a amina a un chip sensor CM5 de Serie S (GE Healthcare) o un chip sensor CM4 de Serie S (GE Healthcare) o, como alternativa, chips producidos dejando primero que los péptidos antigénicos biotinilados preliminarmente interaccionen con, y se inmovilicen sobre, un chip sensor SA de Serie S (certificado) (GE Healthcare).

Después de capturar los anticuerpos de interés sobre estos chips sensores, se dejó que interaccionase un receptor de Fcγ diluido con el tampón de funcionamiento, se midió la cantidad fijada a un anticuerpo y se compararon los anticuerpos. Sin embargo, ya que la cantidad de receptor de Fcγ fijado depende de la cantidad de los anticuerpos capturados, la cantidad de receptor de Fcγ fijado se dividió por la cantidad de cada anticuerpo capturado para obtener los valores corregidos, y se compararon estos valores. Por otra parte, los anticuerpos capturados sobre los chips se lavaron mediante una reacción con glicina-HCl a 10 mM, pH 1.5, y se regeneraron los chips y se utilizaron repetidas veces.

Los análisis cinéticos para calcular los valores de KD de cada anticuerpo alterado para FcγR se realizaron de acuerdo con el método que viene a continuación. Primero, se capturaron los anticuerpos de interés sobre los chips sensores mencionados más arriba, y se dejó que interaccionase un receptor de Fcγ diluido con el tampón de funcionamiento. Se utilizó el programa de evaluación de Biacore para ajustar globalmente los resultados medidos al sensograma obtenido mediante el uso del modelo de fijación de Langmuir a 1:1 y se calcularon la constante de la velocidad de asociación ka (l/mol/s) y la constante de la velocidad de disociación kd (1/s); y a partir de esos valores, se calcularon las constantes de disociación KD (mol/l).

Cuando la interacción entre cada uno de los anticuerpos alterados y el FcγR era débil, y se determinó que el análisis correcto era imposible por el análisis cinético mencionado más arriba, se calcularon las KD de tales interacciones con la siguiente ecuación del modelo de fijación a 1:1 descrita en el Manual de uso del programa de Biacore T100 BR1006-48 Edition AE.

El comportamiento de las moléculas que interaccionan de acuerdo con el modelo de fijación a 1:1 en Biacore se puede describir mediante la ecuación 1 que se muestra a continuación.

[Ecuación 1]

$$R_{eq} = C \bullet R_{máx}/(KD + C) + RI$$

R_{eq}: un gráfico de los niveles de fijación en estado estacionario frente a la concentración del analito

C: concentración

RI: contribución aparente del índice refractivo en la muestra

$R_{máx}$: capacidad de fijación del analito que tiene la superficie

Cuando se reordena esta ecuación, la KD se puede expresar como la ecuación 2 que se muestra a continuación.

[Ecuación 2]

$$KD = C \bullet R_{máx}/(R_{eq} - RI) - C$$

La KD se puede calcular al sustituir los valores de $R_{máx}$, RI y C en esta ecuación. Los valores de RI y C se pueden determinar a partir del sensograma de los resultados de medición y las condiciones de medición. Se calculó la $R_{máx}$ de acuerdo con el método que viene a continuación. Como diana de comparación, para los anticuerpos que tenían interacciones suficientemente fuertes que se evaluaron de manera simultánea

en la misma ronda de medición, se obtuvo el valor de la $R_{máx}$ mediante el ajuste global con el modelo de fijación de Langmuir a 1:1 y, a continuación, se dividió por la cantidad del anticuerpo de comparación capturado sobre el chip sensor y se multiplicó por la cantidad capturada de un anticuerpo alterado a evaluar.

[Ejemplo 3 de referencia] Análisis integral de la fijación de las variantes de Fc al FcγR

Se introdujeron mutaciones en los anticuerpos de tipo IgG1 que tienen disminuida la fijación mediada por Fc por el FcγR activador, de manera específica ambos alotipos de FcγRIIa, tipos H y R, así como realzada la fijación al FcγRIIb con respecto al IgG1; y la fijación a cada FcγR se analizó exhaustivamente.

La región variable (SEQ ID n.º 15) de un anticuerpo contra el glipicano 3 que comprende la CDR de GpH7 que es un anticuerpo antiglipicano 3 con mejora de la cinética en el plasma descrito en la solicitud de patente internacional WO 2009/041062 se utilizó como la cadena H común del anticuerpo. De igual forma, como cadena L común del anticuerpo se utilizó GpL16-k0 (SEQ ID n.º 16) del anticuerpo contra el glipicano 3 con mejora de la cinética en el plasma, descrita en la solicitud de patente internacional WO 2009/041062. Por otra parte, el B3 en el que se ha introducido una mutación K439E en la G1d producida al retirar las Gly y Lys del extremo carboxilo de la IgG1 se utilizó como la región constante de la cadena H del anticuerpo. Esta cadena H se denomina GpH7-B3 (SEQ ID n.º 17) y la cadena L se denomina GpL16-k0 (SEQ ID n.º 16).

Con respecto a GpH7-B3, los aminoácidos que se considera que están implicados en la fijación al FcγR y los aminoácidos circundantes (posiciones 234 a 239, 265 a 271, 295, 296, 298, 300 y 324 a 337, de acuerdo con la numeración EU) se sustituyeron, respectivamente, con los 18 tipos de aminoácidos, excluidos los aminoácidos originales y Cys. Estas variantes de Fc se denominan variantes B3. Las variantes B3 se expresaron y purificaron con el método del ejemplo 1 de referencia y la fijación a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIa de tipo H, FcγRIIa de tipo R, FcγRIIb y FcγRIIIa) se evaluó exhaustivamente con el método del ejemplo 2 de referencia.

Las figuras se produjeron basándose en los resultados del análisis de interacción con cada FcγR mediante el método que viene a continuación. El valor de la magnitud de la fijación al FcγR de cada anticuerpo procedente de la variante B3 se dividió por el valor de la magnitud de la fijación al FcγR del anticuerpo utilizado para la comparación que no tiene mutaciones introducidas en B3 (un anticuerpo que tiene la secuencia de una IgG1 de humano que se produce de forma natural en las posiciones 234 a 239, 265 a 271, 295, 296, 298, 300 y 324 a 337, de acuerdo con la numeración EU). El valor obtenido al multiplicar este valor por 100 se utilizó como indicador de la actividad relativa de fijación al FcγR de cada variante. El eje horizontal muestra el valor de la actividad relativa de fijación al FcγRIIb de cada variante y el eje vertical muestra el valor de la actividad de fijación relativa correspondiente de cada variante por los FcγR de activación: FcγRIa, FcγRIIa de tipo H, FcγRIIa de tipo R y FcγRIIIa (figuras 1, 2, 3 y 4).

Tal y como se muestra con las etiquetas de las figuras 1 a 4, los resultados muestran que de todas las alteraciones, cuando solo se introdujeron las mutaciones denominadas mutación A (alteración producida al sustituir la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp) y la mutación B (alteración producida al sustituir la Leu de la posición 328 (numeración EU) por Glu), se realzaba notablemente la fijación al FcγRIIb y se suprimía notablemente la fijación a ambos tipos de FcγRIIa en comparación con antes de la introducción.

[Ejemplo 4 de referencia] Análisis de RPS de las variantes que se fijan selectivamente al FcγRIIb

Con respecto a la alteración identificada en el ejemplo 1 donde la Pro de la posición 238 (numeración EU) se sustituye por Asp, se analizó en detalle la fijación a cada FcγR.

La región variable de IL6R-H (SEQ ID n.º 18), que es la región variable del anticuerpo contra el receptor de la interleucina 6 de humano descrita en la solicitud de patente internacional WO 2009/125825, se utilizó como la región variable de la cadena H del anticuerpo, y el IL6R-G1d (SEQ ID n.º 19), que comprende G1d con deleción de las Gly y Lys del extremo carboxilo de la IgG1 de humano, se utilizó como la región constante de cadena H del anticuerpo en la cadena H de IgG1. La Pro de la posición 238 (numeración EU) en el IL6R-G1d se sustituyó por Asp para producir IL6R-G1d-v1 (SEQ ID n.º 20). A continuación, la Leu de la posición 328 (numeración EU) en el IL6R-G1d se sustituyó por Glu para producir IL6R-G1d-v2. Por otra parte, para la comparación, la Ser de la posición 267 (numeración EU) se sustituyó por Glu y la Leu de la posición 328 (numeración EU) se sustituyó por Phe en el IL6R-G1d para producir IL6R-G1d-v3, tal y como se describe en el documento 28 que no es patente. El IL6R-L (SEQ ID n.º 21), que es la cadena L del tocilizumab, se utilizó como la cadena L común del anticuerpo; y junto con cada cadena H, los anticuerpos se expresaron y purificaron de acuerdo con el método del ejemplo 1 de referencia. Los anticuerpos obtenidos que comprenden una secuencia de aminoácidos procedente de IL6R-G1d, IL6R-G1d-v1, IL6R-G1d-v2 o IL6R-G1d-v3 como la cadena H del anticuerpo se denominan IgG1, IgG1-v1, IgG1-v2 e IgG1-v3, respectivamente.

A continuación, se llevó a cabo el análisis cinético de las interacciones entre estos anticuerpos y FcγR con el uso de Biacore T100 (GE Healthcare). HBS-EP+ (GE Healthcare) se utilizó como tampón de funcionamiento y se ajustó la temperatura de la medición a 25°C. Se utilizó un chip producido por inmovilización de la proteína A en un chip sensor CM5 de serie S (GE Healthcare) mediante el método de

acoplamiento a aminas. Se capturó un anticuerpo de interés sobre este chip para interaccionar con cada FcγR que se había diluido con el tampón de funcionamiento y se midió la fijación al anticuerpo. Después de la medición, el anticuerpo capturado sobre el chip se lavó y se dejó reaccionar con glicina-HCl a 10 mM, pH 1.5, y se regeneró el chip y se utilizó repetidas veces. Los sensogramas obtenidos como resultados de la medición se analizaron mediante el modelo de fijación de Langmuir a 1:1 con el programa de evaluación de Biacore para calcular la constante de la velocidad de fijación ka (l/mol/s)) y la constante de la velocidad de disociación kd (1/s), y se calculó la constante de disociación KD (mol/l) a partir de estos valores.

Esta vez, ya que la fijación de IgG1-v1 e IgG1-v2 al FcγRIIa de tipo H y al FcγRIIIa era débil, no se pudieron calcular los parámetros cinéticos, tales como la KD, a partir del método analítico mencionado más arriba. En cuanto a tales interacciones, se calcularon los valores de KD mediante el modelo de fijación a 1:1 descrito en el manual del programa de Biacore T100 BR1006-48 Edition AE.

El comportamiento de las moléculas que interaccionan de acuerdo con el modelo de fijación a 1:1 en Biacore se puede describir mediante la ecuación 1 que se muestra a continuación.

[Ecuación 1]

$$R_{eq} = C \bullet R_{máx}/(KD + C) + RI$$

R_{eq}: un gráfico de los niveles de fijación en estado estacionario frente a la concentración de analitos

C: concentración

RI: contribución del índice refractivo aparente en la muestra

$R_{máx}$: capacidad de fijación del analito de la superficie

Cuando se reordena esta ecuación, la KD se puede expresar como la ecuación 2 que se muestra a continuación.

[Ecuación 2]

$$KD = C \bullet R_{máx}/(R_{eq} - RI) - C$$

La KD se puede calcular al sustituir los valores de $R_{máx}$, RI y C en esta ecuación. A partir de las condiciones de medición actuales, se puede utilizar RI = 0, C = 2 µmol/l. Por otra parte, el valor de $R_{máx}$ obtenido al ajustar globalmente el sensograma obtenido como resultado de analizar la interacción de cada FcγR con la IgG1 con el modelo de fijación de Langmuir a 1:1 se dividió por la cantidad de IgG1 capturada, esto se multiplicó por la cantidad de IgG1-v1 e IgG1-v2 capturada, y el valor resultante se utilizó como $R_{máx}$. Este cálculo se basa en la hipótesis de que la cantidad máxima de cada FcγR que se puede fijar a la IgG1 permanece inalterada para todas las variantes producidas al introducir mutaciones en la IgG1, y la $R_{máx}$ en el momento de la medición es proporcional a la cantidad de anticuerpo fijado sobre el chip en el momento de la medición. R_{eq} se definió como la magnitud de la fijación de cada FcγR a cada variante sobre el chip sensor observada en el momento de la medición.

Con estas condiciones de medición, la magnitud de la fijación (R_{eq}) de IgG1-v1 e IgG1-v2 a FcγRIIa de tipo H era aproximadamente de 2.5 UR y 10 UR, respectivamente, y la magnitud de la fijación (R_{eq}) de IgG1-v1 e IgG1-v2 a FcγRIIIa era aproximadamente de 2.5 UR y 5 UR, respectivamente. La cantidad de IgG1, IgG1-v1 e IgG1-v2 capturadas en el análisis de las interacciones con el FcγRIIa de tipo H era de 452 UR, 469.2 UR y 444.2 UR, respectivamente, y la cantidad de IgG1, IgG1-v1 e IgG1-v2 capturadas en el análisis de las interacciones con el FcγRIIIa era de 454.5 UR, 470.8 UR y 447.1 UR, respectivamente. Los valores de $R_{máx}$ obtenidos del ajuste global de los sensogramas obtenidos como resultado de analizar la interacción de IgG1 con FcγRIIa de tipo H y FcγRIIIa con el modelo de fijación de Langmuir a 1:1 eran de 69.8 UR y 63.8 UR, respectivamente. Cuando se utilizaron estos valores, los valores de $R_{máx}$ calculados de IgG1-v1 e IgG1-v2 por el FcγRIIa de tipo H eran de 72.5 UR y 68.6 UR, respectivamente, y los valores de $R_{máx}$ calculados de IgG1-v1 e IgG1-v2 por el FcγRIIIa eran de 66.0 UR y 62.7 UR, respectivamente. Estos valores se sustituyeron en la ecuación 2 para calcular la KD de IgG1-v1 e IgG1-v2 para el FcγRIIa de tipo H y para el FcγRIIIa.

[Ecuación 2]

$$KD = C \bullet R_{máx}/(R_{eq} - RI) - C$$

Los valores de KD de IgG1, IgG1-v1, IgG1-v2 e IgG1-v3 para cada FcγR (los valores de KD de cada anticuerpo para cada FcγR) se muestran en la tabla 1 y los valores relativos de KD de IgG1-v1, IgG1-v2 e

IgG1-v3 obtenidos al tomar los valores de KD de IgG1 para cada FcγR y dividirlos por los valores de KD de IgG1-v1, IgG1-v2 e IgG1-v3 para cada FcγR (los valores de KD relativos de cada anticuerpo para cada FcγR) se muestran en la tabla 2.

[Tabla 15]

	IgG1	IgG1-v1	IgG1-v2	IgG1-v3
FcγRIa	3.4E-10	7.3E-09	4.6E-10	1.9E-10
FcγRIIa R	1.2E-06	1.2E-05	2.9E-06	2.3E-09
FcγRIIa H	7.7E-07	5.6E-05*	1.2E-05*	1.5E-06
FcγRIIb	5.3E-06	1.1E-06	2.3E-06	1.3E-08
FcγRIIIa	3.1E-06	5.1E-05*	2.3E-05*	8.8E-06
			(mol/l)	

En la tabla 15 que se muestra aquí arriba, «*» significa que el valor de KD se calculó con la ecuación 2 ya que no se observó suficiente fijación del FcγR a la IgG.

[Ecuación 2]

$$KD = C \bullet R_{máx}/(R_{eq} - RI) - C$$

[Tabla 16]

	IgG1-v1	IgG1-v2	IgG1-v3
FcγRIa	0.047	0.74	1.8
FcγRIIa R	0.10	0.41	522
FcγRIIa H	0.014	0.064	0.51
FcγRIIb	4.8	2.3	408
FcγRIIIa	0.061	0.14	0.35

(EL VALOR OBTENIDO AL DIVIDIR EL VALOR DE KD DE IgG1 PARA CADA FcγR POR EL VALOR DE KD DE CADA ANTICUERPO DE TIPO IgG1 PARA CADA FcγR)

De acuerdo con la tabla 16, cuando se compara la actividad de fijación de IgG1-v1 con la de IgG1, la actividad de fijación de IgG1-v1 disminuyó a 0.047 veces para el FcγRIa, disminuyó a 0.10 veces para el FcγRIIa de tipo R, disminuyó a 0.014 veces para el FcγRIIa de tipo H, disminuyó a 0.061 veces para el FcγRIIIa y se incrementó a 4.8 veces para el FcγRIIb.

Por otra parte, de acuerdo con la tabla 16, cuando se compara con la de IgG1, la actividad de fijación de IgG1-v2 disminuyó a 0.74 veces para el FcγRIa, disminuyó a 0.41 veces para el FcγRIIa de tipo R, disminuyó a 0.064 veces para el FcγRIIa de tipo H, disminuyó a 0.14 veces para FcγRIIIa y se incrementó a 2.3 veces para FcγRIIb.

Más específicamente, estos resultados demostraron que la IgG1-v1, que tiene una alteración de sustitución de la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp, y la IgG1-v2, que tiene una alteración de sustitución de la Leu en la posición 328 (numeración EU) por Glu, tienen las propiedades de debilitar la fijación a todos los FcγR activadores, entre ellos los dos alotipos de FcγRIIa, al mismo tiempo que mejora la fijación al FcγRIIb que es un FcγR inhibidor.

A continuación, se evaluó la selectividad de la variante obtenida por el FcγRIIb mediante la relación de la actividad de fijación al FcγRIIb entre la actividad de fijación por el tipo R o el tipo H de FcγRIIa como indicador. Específicamente, I/A(R) o I/A(H), que es un valor obtenido al dividir el valor de KD para FcγRIIa de tipo R o de tipo H entre el valor de KD para FcγRIIb, se utilizó como indicador de la selectividad de FcγRIIb con respecto a cada FcγRIIa. Este indicador tiene un valor más grande cuando el valor de KD para FcγRIIb se hace más pequeño o cuando el valor de KD para FcγRIIa se hace más grande. Es decir, una variante que muestra un valor más grande muestra un incremento de la actividad de fijación al FcγRIIb con respecto al FcγRIIa. Estos indicadores se resumen en la tabla 17 para cada variante.

[Tabla 17]

	IgG1	IgG1-v1	IgG1-v2	IgG1-v3
I/A (R)	0.23	11	1.3	0.18
I/A (H)	0.15	51	5.2	115

De acuerdo con los resultados de la tabla 17, en comparación con IgG1, la IgG1-v3 que se produjo al aplicar la tecnología existente mostraba un valor de I/A(H) mayor que el de IgG1 y una mayor selectividad por el FcγRIIb, pero un valor de I/A(R) menor que el de IgG1 y mejorada la selectividad por el FcγRIIb. Por otra parte, se encontró que la IgG1-v1 y la IgG1-v2 de los ejemplos tienen valores de I/A(R) y I/A(H) mayores que los de IgG1 y mejor selectividad por el FcγRIIb que por ambos alotipos de FcγRIIa.

Hasta ahora no se han descrito alteraciones que tengan tales propiedades y son, en realidad, muy raras, tal y como se muestra en las figuras 18, 19, 20 y 21. Las alteraciones producidas al sustituir la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp o al sustituir la Leu de la posición 328 (numeración EU) por Glu son muy útiles para el desarrollo de agentes terapéuticos contra las enfermedades inflamatorias inmunitarias y similares.

Por otra parte, en la tabla 2 se muestra que la IgG1-v3 descrita en el documento 28 que no es patente ciertamente muestra un realce de la fijación al FcγRIIb de 408 veces, mientras que la fijación al FcγRIIa de tipo H disminuye a 0.51 veces y la fijación al FcγRIIa de tipo R se realza a 522 veces. De acuerdo con estos resultados, ya que IgG1-v1 e IgG1-v2 suprimen su fijación al FcγRIIa de los tipos R y H, y realzan su fijación al FcγRIIb, se considera que son variantes que se fijan con mayor selectividad al FcγRIIb en comparación con la IgG1-v3. Específicamente, las alteraciones producidas al sustituir la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp o al sustituir la Leu de la posición 328 (numeración EU) por Glu son muy útiles para el desarrollo de agentes terapéuticos contra las enfermedades inflamatorias inmunitarias y similares.

[Ejemplo 5 de referencia] Efectos de la combinación de las alteraciones de fijación selectivas del FcγRIIb con otras sustituciones de aminoácidos de la región Fc

Se intentó realzar más la selectividad por el FcγRIIb basándose en la variante que tiene mejorada la selectividad por el FcγRIIb y tiene una sustitución de la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp que se encuentra en los ejemplos 3 y 4 de referencia.

Primero, en el IL6R-G1d_v1 (SEQ ID n.º 20) producido por la introducción de la alteración producida al sustituir la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp en el IL6R-G1d, se introdujo la sustitución de la Leu de la posición 328 (numeración EU) por Glu tal y como se describe en el ejemplo 4 de referencia que mejora la selectividad por el FcγRIIb para producir la variante IL6R-G1d-v4. Esto se combinó con el IL6R-L (SEQ ID n.º 21) y se preparó de acuerdo con el método del ejemplo 1 de referencia. El anticuerpo obtenido que tiene la secuencia de aminoácidos procedente de IL6R-G1d-v4 como la cadena H del anticuerpo se ha denominado IgG1-v4. Se evaluó la actividad de fijación al FcγRIIb que presentan IgG1, IgG1-v1, IgG1-v2 e IgG1-v4 de acuerdo con el método del ejemplo 2 de referencia, y los resultados se muestran en la tabla 18.

[Tabla 18]

Variante	Alteración	KD para FcγRIIb (mol/l)	KD relativa para FcγRIIb (KD de IgG1/KD de cada variante)
IgG1	-	5.30E-06	1
IgG1-v1	Sustitución de la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp	1.10E-06	4.8
IgG1-v2	Sustitución de la Leu de la posición 328 (numeración EU) por Glu	2.30E-06	2.3
IgG1-v4	Sustitución de la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp y sustitución de la Leu de la posición 328 (numeración EU) por Glu	1.10E-05	0.47

De los resultados de la tabla 18, ya que L328E mejora la actividad de fijación al FcγRIIb 2.3 veces en comparación con IgG1, la combinación de esta con P238D, que de igual forma mejora la actividad de fijación al FcγRIIb 4.8 veces en comparación con IgG1, se anticipó que incrementaba adicionalmente el grado de realce de la actividad de fijación al FcγRIIb; sin embargo, en realidad, la actividad de fijación al FcγRIIb de la variante que contiene una combinación de estas alteraciones disminuyó a 0.47 veces en comparación con la de IgG1. Este resultado es un efecto que no se podía predecir a partir de las correspondientes alteraciones.

De igual forma, en el IL6R-G1d_v1 (SEQ ID n.º 20) producido al introducir en el IL6R-G1d la alteración producida al sustituir la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp, se introdujeron las sustituciones de la Ser de la posición 267 (numeración EU) por Glu y de la Leu de la posición 328 (numeración EU) por Phe, tal y como se describe en el ejemplo 4 de referencia, que mejoran la actividad de fijación al FcγRIIb, y se preparó la variante IL6R-G1d-v5 de acuerdo con el método del ejemplo 1 de referencia. El anticuerpo obtenido que tiene la secuencia de aminoácidos procedente de IL6R-G1d-v5 como la cadena H del anticuerpo se ha denominado IgG1-v5. Se evaluó la actividad de fijación al FcγRIIb que presentan IgG1, IgG1-v1, IgG1-v3 e IgG1-v5 de acuerdo con el método del ejemplo 2 de referencia, y los resultados se muestran en la tabla 19.

S267E/L328F que tenía un efecto de realce sobre FcγRIIb en el ejemplo 4 de referencia se introdujo en la variante P238D y se evaluó su actividad de fijación al FcγRIIb antes y después de introducir esta alteración. Los resultados se muestran en la tabla 19.

[Tabla 19]

Variante	Alteración	KD para FcγRIIb (mol/l)	KD relativa para FcγRIIb (KD de IgG1/KD de cada variante)
IgG1	-	5.30E-06	1
IgG1-v1	Sustitución de la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp	1.10E-06	4.8
IgG1-v3	Sustitución de la Ser de la posición 267 (numeración EU) por Glu y sustitución de la Leu de la posición 328 (numeración EU) por Phe	1.30E-08	408
IgG1-v5	Sustitución de la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp, sustitución de la Ser de la posición 267 (numeración EU) por Glu y sustitución de Leu de la posición 328 (numeración EU) por Phe	4.50E-07	12

De los resultados de la tabla 19, ya que S267E/L328F mejora la actividad de fijación al FcγRIIb 408 veces en comparación con IgG1, la combinación de esta con P238D, que de igual forma mejora la actividad de fijación al FcγRIIb 4.8 veces en comparación con la IgG1, se anticipó que incrementa adicionalmente el grado de mejora de la actividad de fijación al FcγRIIb; sin embargo, en realidad, de una manera similar al ejemplo anterior, la actividad de fijación al FcγRIIb que presenta la variante que contiene una combinación de estas alteraciones mejoró solo 12 veces o así en comparación con la de IgG1. Este resultado es también un efecto que no se podía predecir a partir de los efectos de las correspondientes alteraciones.

Estos resultados demostraban que, aunque la sustitución de la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp solo mejora la actividad de fijación al FcγRIIb, no se muestra el efecto cuando se combina con otras alteraciones que realzan la actividad de fijación al FcγRIIb. Una explicación para esto puede ser que la estructura en la interfase de interacción entre la Fc y el FcγR cambia al introducir la sustitución de la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp y los efectos de las alteraciones que se observan en el anticuerpo que se produce de forma natural ya no quedan reflejados en los resultados. De acuerdo con esto, se consideró que era muy difícil crear una Fc con una excelente selectividad por el FcγRIIb mediante el uso de una Fc que comprende la sustitución de la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp como molde, ya que no se podía aplicar la información sobre los efectos de las alteraciones que se obtienen con los anticuerpos que se producen de forma natural.

[Ejemplo 6 de referencia] Análisis exhaustivo de la fijación al FcγRIIb que tienen las variantes en las que se introdujo una alteración en la porción de la bisagra además de la alteración P238D

Tal y como se muestra en el ejemplo 5 de referencia, en una Fc producida al sustituir la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp en una IgG1 de humano que se produce de forma natural, no se pudo obtener un efecto combinatorio anticipado incluso al combinarla con otra alteración que se predecía que incrementaba adicionalmente la fijación al FcγRIIb. Por lo tanto, basándose en la variante de Fc producida al sustituir la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp, se llevó a cabo una evaluación mediante la introducción exhaustiva de alteraciones en la Fc para hallar las variantes que realzan más la fijación al FcγRIIb. Para las cadenas H del anticuerpo, se produjo el IL6R-F11 (SEQ ID n.º 22) mediante la introducción de una alteración en la que se sustituye la Met de la posición 252 (numeración EU) por Tyr y una alteración en la que se sustituye la Asn de la posición 434 (numeración EU) por Tyr en el IL6R-G1d (SEQ ID n.º 19) y se preparó el IL6R-F652 mediante la introducción de una alteración más por sustitución de la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp. Se prepararon plásmidos de expresión que contenían una secuencia de la cadena H del anticuerpo para cada una de las secuencias de cadena H del anticuerpo producidas por sustitución de la región cerca del resto de la posición 238 (numeración EU) (posiciones 234

a 237 y 239 (numeración EU)) en el IL6R-F652, cada una con 18 aminoácidos, excluidos los aminoácidos originales y la cisteína. El IL6R-L (SEQ ID n.º 21) se utilizó como cadena L común del anticuerpo para todos los anticuerpos. Estas variantes se expresaron, purificaron y expresaron mediante el método del ejemplo 1 de referencia. Estas variantes de Fc se denominan variantes PD. Las interacciones de cada variante PD con el FcγRIIa de tipo R y con el FcγRIIb se evaluaron exhaustivamente mediante el método del ejemplo 2 de referencia.

Con respecto a los resultados de analizar la interacción con los correspondientes FcγR, se produjo una figura de acuerdo con el método que viene a continuación. El valor obtenido al dividir el valor por la magnitud de la fijación de cada variante PD a cada FcγR entre el valor de la magnitud de fijación al FcγR del anticuerpo prealterado que se utiliza como control (IL6R-F652/IL6R-L, que tiene una alteración por sustitución de la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp) y a continuación multiplicar el resultado por 100, se utilizó como el valor relativo de la actividad de fijación de cada variante PD a cada FcγR. El eje horizontal muestra los valores relativos de la actividad de fijación al FcγRIIb que presenta cada variante PD y el eje vertical muestra los valores relativos de los valores de la actividad de fijación al FcγRIIa de tipo R que presenta cada variante PD (figura 22).

Como resultado, se encontró que once tipos de alteraciones tenían los efectos de realzar la fijación al FcγRIIb y de mantener o realzar la fijación al FcγRIIa de tipo R en comparación con el anticuerpo antes de introducirle las alteraciones. La actividad de fijación al FcγRIIb y al FcγRIIaR que presentan estas once variantes se resumen en la tabla 20. En la tabla, «alteración» hace referencia a la alteración introducida en el IL6R-F11 (SEQ ID n.º 22).

[Tabla 20]

NOMBRE DE LA VARIANTE	Alteración	ACTIVIDAD RELATIVA DE FIJACIÓN AL FcγRIIb	ACTIVIDAD RELATIVA DE FIJACIÓN AL FcγRIIaR
IL6R-F652/IL6R-L	P238D	100	100
IL6R-PD042/IL6R-L	P238D/L234W	106	240
IL6R-PD043/IL6R-L	P238D/L234Y	112	175
IL6R-PD079/IL6R-L	P238D/G237A	101	138
IL6R-PD080/IL6R-L	P238D/G237D	127	222
IL6R-PD081/IL6R-L	P238D/G237E	101	117
IL6R-PD082/IL6R-L	P238D/G237F	108	380
IL6R-PD086/IL6R-L	P238D/G237L	112	268
IL6R-PD087/IL6R-L	P238D/G237M	109	196
IL6R-PD094/IL6R-L	P238D/G237W	122	593
IL6R-PD095/IL6R-L	P238D/G237Y	124	543
IL6R-PD097/IL6R-L	P238D/S239D	139	844

En la figura 23 se muestran los valores relativos para la actividad de fijación al FcγRIIb obtenidos con la introducción adicional de estas once alteraciones en una variante que lleva la alteración P238D y los valores relativos de la actividad de fijación al FcγRIIb obtenidos con la introducción de estas alteraciones en una Fc que no contiene la alteración P238D en el ejemplo 3 de referencia. Estas once alteraciones realzaron la magnitud de la fijación al FcγRIIb en comparación con antes de la introducción cuando se introdujeron además en la variante P238D, pero, en cambio, se observó el efecto de disminución de la fijación al FcγRIIb para ocho de esas alteraciones, excepto G237F, G237W y S239D, cuando se introdujeron en la variante que no contiene P238D (GpH7-B3/GpL16-k0) utilizada en el ejemplo 3 de referencia.

El ejemplo 5 de referencia y estos resultados demostraron que, a partir de los efectos de introducir alteraciones en una IgG1 que se produce de forma natural, es difícil predecir los efectos de la introducción de las mismas alteraciones en la variante que contiene una Fc con la alteración P238D. Es decir, no habría sido posible descubrir estas ocho alteraciones identificadas esta vez sin esta investigación.

Los resultados de medir los valores de KD de las variantes indicadas en la tabla 20 para FcγRIa, FcγRIIaR, FcγRIIaH, FcγRIIb y FcγRIIIaV mediante el método del ejemplo 2 de referencia se resumen en la tabla 21. «Alteración» en la tabla hace referencia a la alteración introducida en el IL6R-F11 (SEQ ID n.º 22). El molde utilizado para producir el IL6R-F11, IL6R-G1d/IL6R-L, se indica con un asterisco (*). Por otra parte, «KD(IIaR)/KD(IIb)» y «KD(IIaH)/KD(IIb)» en la tabla muestran, respectivamente, el valor obtenido al dividir el valor de KD de cada variante para FcγRIIaR entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb, y el valor obtenido al dividir el valor de KD de cada variante para FcγRIIaH entre el valor de KD de cada variante para

FcγRIIb. «KD(IIb) del polipéptido original/KD(IIb) del polipéptido alterado» se refiere a un valor obtenido al dividir el valor de KD del polipéptido original para FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb. Además, la tabla 21 muestra los valores de KD para la más fuerte de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH de cada variante/valores de KD para las más fuertes de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH del polipéptido original. Aquí, polipéptido original se refiere a una variante que tiene IL6R-F11 (SEQ ID n.º 22) como cadena H. Se determinó que debido a la fijación débil de FcγR a la IgG, era imposible analizar con exactitud mediante el análisis cinético y, así pues, las celdas rellenas de gris de la tabla 21 muestran los valores calculados con la ecuación 2 del ejemplo 2 de referencia.

[Ecuación 2]

$$KD = C \bullet R_{máx}/(R_{eq} - RI) - C$$

En la tabla 21 se muestra que todas las variantes realzaban su afinidad por FcγRIIb en comparación con IL6R-F11 y el margen de mejora era de 1.9 veces a 5.0 veces. La relación del valor de KD de cada variante para FcγRIIaR/valor de KD de cada variante para FcγRIIb, y la relación del valor de KD de cada variante para FcγRIIaH/valor de KD de cada variante para FcγRIIb representa una actividad de fijación al FcγRIIb con respecto a la actividad de fijación al FcγRIIaR y la actividad de fijación al FcγRIIaH, respectivamente. Esto es, estos valores muestran el grado de selectividad de fijación de cada variante por el FcγRIIb y un valor más grande indica una selectividad de fijación más alta por el FcγRIIb. Para el polipéptido original IL6R-F11/IL6R-L, la relación del valor de KD para FcγRIIaR/valor de KD para FcγRIIb y la relación del valor de KD para FcγRIIaH/valor de KD para FcγRIIb son ambas de 0.7 y, de acuerdo con esto, todas las variantes de la tabla 21 mostraron una mejora de la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el polipéptido original. Cuando el valor de KD para la más fuerte de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH de una variante/valor de KD para la más fuerte de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH del polipéptido original es 1 o mayor, esto significa que la más fuerte de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH de una variante tiene una fijación equivalente o reducida en comparación con la fijación por la más fuerte de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH del polipéptido original. Dado que este valor era de 0.7 a 5.0 para las variantes obtenidas esta vez, se puede decir que la fijación por la más fuerte de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH de las variantes obtenidas esta vez era casi la misma o disminuía en comparación con el polipéptido original. Estos resultados demostraban que, en comparación con el polipéptido original, las variantes obtenidas esta vez tenían realzada la actividad de fijación al FcγRIIb al mismo tiempo que mantienen o disminuyen la actividad de fijación al FcγRIIa de tipo R y tipo H y, así pues, tienen realzada la selectividad por el FcγRIIb. Por otra parte, en comparación con IL6R-F11, todas las variantes tenían menos afinidad por FcγRIa y FcγRIIIaV.

[Tabla 21]

NOMBRE DE LA VARIANTE	ALTERACIÓN	KD PARA FcγRIa (mol/l)	KD PARA FcγRIIaR (mol/l)	KD PARA FcγRIIaH (mol/l)	KD PARA FcγRIIb (mol/l)	KD PARA FcγRIIIaV (mol/l)	KD(IIaR)/KD(IIb)	KD(IIaH)/KD(IIb)	KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO	VALOR DE KD PARA LA MÁS FUERTE DE LAS ACTIVIDADES DE FIJACIÓN DE UNA VARIANTE PARA FcγRIIaR Y FcγRIIaH/VALOR DE KD PARA LA MÁS FUERTE DE LAS ACTIVIDADES DE FIJACIÓN DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL PARA FcγRIIaR Y FcγRIIaH
IL6R-G1d/IL6R-L	*	3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	0.3	2.6	0.1
IL6R-F11/IL6R-L		9.0E-10	5.0E-06	5.0E-06	6.8E-06	1.5E-05	0.7	0.7	1.0	1.0
IL6R-PD042/IL6R-L	L234W/P238D	6.3E-06	1.6E-05	1.9E-05	2.0E-06	3.7E-05	8.1	9.5	3.4	3.2
IL6R-PD043/IL6R-L	L234Y/P238Q	7.5E-08	2.6E-05	2.3E-05	1.6E-06	4.5E-05	15.9	14.4	4.2	4.6
IL6R-PD079/IL6R-L	G237A/P238D	1.4E-07	3.2E-05	2.1E-05	3.0E-06	3.7E-05	10.5	7.0	2.3	4.2
IL6R-PD080/IL6R-L	G237D/F2380	1.4E-07	2.1E-05	2.5E-05	2-0E-06	4.3E-05	10.7	12.8	3.5	4.2
IL6R-PD081/IL6R-L	G237E/P238D	3.4E-07	3.8E-05	2.5E-05	3.6E-06	4.1E-05	10.6	7.0	1.9	5.0
IL6R-PD082/IL6R-L	G237F/P238D	5.2E-08	1.4E-05	1.6E-05	3.4E-06	4.3E-05	4.1	4.7	2.0	2.8
IL6R-PD086/IL6R-L	G237L/P238D	1.2E-07	1.8E-05	1.8E-05	2.6E-06	4.1E-05	6.9	7.1	2.7	3.5
IL6R-PD087/IL6R-L	G237M/P238D	5.2E-08	2.2E-05	2.0E-05	2.9E-06	3.7E-05	7.7	7.0	2.4	4.0
IL6R-PD094/IL6R-L	G237W/P238D	3.6E-08	7.2E-06	1.2E-05	2.3E-06	3.8E-05	3.1	5.2	2.9	1.4
IL6R-PD095/IL6R-L	G237Y/P238D	9.3E-08	7.9E-06	1.5E-05	2.3E-06	4.2E-05	3.4	6.4	2.9	1.6
IL6R-PD097/IL6R-L	P238D/S238D	4.9E-09	3.5E-06	1.9E-05	1.4E-06	1.7E-05	2.6	14.0	5.0	0.7

[Ejemplo 7 de referencia] Análisis de la estructura por rayos X de un complejo formado entre una Fc que contiene P238D y una región extracelular de FcγRIIb

Tal y como se indicó más arriba en el ejemplo 5 de referencia, incluso aunque se introduzca en la Fc que contiene P238D una alteración que mejora la actividad de fijación al FcγRIIb o la selectividad por el FcγRIIb, se encontró que disminuía la actividad de fijación al FcγRIIb, y la razón de esto puede ser que la estructura de la interfase de interacción entre la Fc y el FcγRIIb cambia debido a la introducción de P238D. Por lo tanto, en busca de la razón de este fenómeno, la estructura tridimensional del complejo formado entre una Fc de la IgG1 que contiene la mutación P238D (de aquí en adelante, Fc(P238D)) y la región extracelular de FcγRIIb se esclareció mediante análisis de la estructura del cristal por rayos X, y la estructura tridimensional y el modo de fijación se compararon con los del complejo formado entre la Fc de una IgG1 que se produce de forma natural (de aquí en adelante, Fc(tipo silvestre)) y la región extracelular de FcγRIIb. Se han publicado muchos resultados sobre la estructura tridimensional de un complejo formado entre una Fc y una región extracelular de FcγR; y se han analizado las estructuras tridimensionales del complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIIb (*Nature*, 2000, 400: 267-273; *J. Biol. Chem*. 2011, 276: 16469-16477), complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIIa (*Proc. Natl. Acad. Sci*. *USA*, 2011, 108: 12669-126674), y complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIa (*J. Imunol*. 2011, 187: 3208-3217). Aunque no se ha analizado la estructura tridimensional del complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIb, se conoce la estructura tridimensional para FcγRIIa de un complejo formado con la Fc(tipo silvestre), y la secuencia de aminoácidos de las regiones extracelulares de FcγRIIa y FcγRIIb concuerdan al 93% y tienen una homología muy alta. Así pues, la estructura tridimensional del complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIb se predijo mediante modelización con la estructura del cristal del complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIa.

Se determinó la estructura tridimensional del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb mediante el análisis de la estructura del cristal por rayos X a una resolución de 2.6 Å. La estructura obtenida como resultado de este análisis se muestra en la figura 24. La región extracelular de FcγRIIb está fijada entre dos dominios CH2 de Fc y es similar a las estructuras tridimensionales de los complejos formados entre Fc(tipo silvestre) y la correspondiente región extracelular de FcγRIIIa, FcγRIIIb o FcγRIIa analizados hasta ahora.

A continuación, para una comparación detallada, la estructura del cristal del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb y la estructura modelo del complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIb, se superpusieron mediante el ajuste por mínimos cuadrados basado en la distancia de las parejas de átomos Cα con respecto a la región extracelular de FcγRIIb y el dominio A del CH2 de Fc (figura 25). En ese caso, el grado de solapamiento entre los dominios B del CH2 de Fc no era satisfactorio y se encontraron diferencias conformacionales en esta porción. Por otra parte, mediante la estructura del cristal del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb y la estructura modelo del complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIb, se extrajeron las parejas de átomos que tienen una distancia de 3.7 Å o menos entre la región extracelular de FcγRIIb y el dominio B del CH2 de Fc, y se compararon para observar las diferencias de las interacciones interatómicas entre el FcγRIIb y el dominio B del CH2 de Fc en Fc(tipo silvestre) y Fc(P238D). Tal y como se muestra en la tabla 22, las interacciones interatómicas entre el dominio B del CH2 de Fc y el FcγRIIb no concuerdan en la Fc(P238D) ni en la Fc(tipo silvestre).

[Tabla 22]

ÁTOMO DE FcγRIIb	**COMPAÑERO DE INTERACCIÓN DEL DOMINIO B DEL CH2 DE LA Fc(P648D) (DISTANCIA ENTRE LOS ÁTOMOS, Å)**	**COMPAÑERO DE INTERACCIÓN DEL DOMINIO B DEL CH2 DE LA Fc(tipo silvestre) (DISTANCIA ENTRE LOS ÁTOMOS, Å)**
Val 116 CG2		Asp 265 QD2 (3.47) Gly 237 O (3.65)
Ser 126 OG	Ser 298 N (3.31) Ser 298 CB (3.32) Tyr 296 O (3.05)	
Lys 128 CA	Ser 298 OG (3.50)	
Phe 129 CB	Ser 298 O (3.36)	
Phe 129 CD2		Asn 297 CB (3.50) Asn 297 CG (3.43)

Lys 128 C	Ser 298 OG (3.47)	
Phe 129 N	Ser 298 OG (3.30)	
Phe 129 O	Ser 267 OG (3.54)	
Arg 131 CB		Val 266 O (3.02)
Arg 131 CG		Val 266 O (3.22)
Arg 131 CD		Val 266 CGI (3.45) Val 266 C (3.55) Val 266 O (3.10)
Arg 131 NE	Ala 327 O (3.60)	Val 266 C (3.66) Val 266 O (3.01) Val 266 N (3.49)
Arg 131 CZ	Asp 270 CG (3.64) Asp 270 OD2 (3.22) Asp 270 OD1 (3.27) Ala 327 CB (3.63)	Val 266 N (3.13)
Arg 131 NH1	Asp 270 CG (3.19) Asp 270 OD2 (2.83) Asp 270 OD1 (2.99) Ser 267 CB (3.56)	Val 266 CGI (3.47) Val 266 N (3.43) Thr 299 OG1 (3.66) Ser 298 O (3.11)
Arg 131 NH2	Asp 270 CG (3.20) Asp 270 OD2 (2.80) Asp 270 OD1 (2.87) Ala 327 CB (3.66)	Asp 265 CA (3.16) Val 266 N (3.37)
Tyr 157 CE1		Leu 234 CG (3.64) Leu 234 CD1 (3.61)
Tyr 157 OH		Gly 236 O (3.62) Leu 234 CA (3.48) Leu 234 CG (3.45)

Por otra parte, la estructura del cristal por rayos X del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb y la estructura modelo del complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIb se superpusieron mediante el ajuste por mínimos cuadrados basado en las distancias de las parejas de átomos Cα con respecto al dominio A del CH2 de Fc solamente o al dominio B del CH2 de Fc únicamente, y se comparó la estructura detallada cerca de P238D. La localización del resto aminoacídico de la posición 238 (numeración EU), que es la posición en la que se introdujo la mutación, cambia entre la Fc(P238D) y la Fc(tipo silvestre), y se puede ver que junto con este cambio, la estructura del lazo cercano que continúa desde la región de bisagra cambia entre la Fc(P238D) y la Fc(tipo silvestre) (figura 26). Originalmente, en la Fc(tipo silvestre), la Pro de la posición 238 (numeración EU) está presente en el lado interior de la proteína y forma un núcleo hidrófobo con los restos circundantes. Sin embargo, cuando este resto cambia a una Asp cargada y muy hidrófila, su presencia en el mismo núcleo hidrófobo causaría una desventaja energética en términos de desolvatación. Por lo tanto, en la Fc(P238D), para cancelar esta situación energéticamente desventajosa, el resto aminoacídico de la posición 238 (numeración EU) cambia su orientación para enfrentarse al lado del solvente, y esto podría haber causado este cambio en la estructura cercana del lazo. Por otra parte, ya que este lazo continúa desde la región bisagra interconectada mediante un enlace S-S, su cambio estructural no se limitará a un cambio local y afectará al posicionamiento relativo del dominio A y del dominio B del CH2 de Fc. Como resultado, han cambiado las interacciones interatómicas entre el FcγRIIb y el dominio B del CH2 de Fc. Por lo tanto, no se pudieron observar los efectos predichos cuando las

alteraciones que mejoran la selectividad y la actividad de fijación por el FcγRIIb en una IgG que se produce de forma natural se combinaron con una Fc que contenía la alteración P238D.

Por otra parte, como resultado de los cambios estructurales debido a la introducción de P238D en el dominio A del CH2 de Fc, se ha encontrado un puente de hidrógeno entre la cadena principal de la Gly de la posición adyacente 237 (numeración EU) y la Tyr de la posición 160 en el FcγRIIb (figura 27). El resto en el FcγRIIa que corresponde a esta Tyr 160 es Phe; y cuando la fijación es al FcγRIIa, no se forma este puente de hidrógeno. El aminoácido de la posición 160 es una de las pocas diferencias entre FcγRIIa y FcγRIIb en la interfase de la interacción con la Fc, la presencia de este puente de hidrógeno que es específico de FcγRIIb se supone que ha conducido a la mejora de la actividad de fijación al FcγRIIb y a la disminución de la actividad de fijación al FcγRIIa en la Fc(P238D), y a la mejora de su selectividad. Además, en el dominio B del CH2 de Fc se observa una interacción electrostática entre el Asp de la posición 270 (numeración EU) y la Arg de la posición 131 en el FcγRIIb (figura 28). En el FcγRIIa de tipo H, que es uno de los alotipos de FcγRIIa, el resto correspondiente es His y, por lo tanto, no puede formar esta interacción electrostática. Esto puede explicar por qué disminuye la actividad de fijación a la Fc(P238D) en el FcγRIIa de tipo H en comparación con el FcγRIIa de tipo R. Las observaciones basadas en tales resultados del análisis de la estructura del cristal por rayos X mostraban que el cambio de la estructura del lazo al lado de P238D debido a la introducción de P238D y el cambio acompañante en el posicionamiento relativo del dominio causa la formación de nuevas interacciones que no se encuentran en la IgG que se produce de forma natural, y esto condujo a un perfil de fijación selectiva de las variantes de P238D por el FcγRIIb.

[Expresión y purificación de la Fc(P238D)]

Se preparó una Fc que contenía la alteración P238D del modo que viene a continuación. Primero, la Cys de la posición 220 (numeración EU) de hIL6R-IgG1-v1 (SEQ ID n.º 20) se sustituyó por Ser. A continuación, se clonó por PCR la secuencia genética de la Fc(P238D) desde el Glu de la posición 216 (numeración EU) hasta el extremo carboxilo. Con esta secuencia genética clonada se llevaron a cabo la producción de los vectores de expresión, y la expresión y purificación de la Fc(P238D) de acuerdo con el método del ejemplo 1 de referencia. La Cys de la posición 220 (numeración EU) forma un puente disulfuro con la Cys de la cadena L en la IgG1 general. La cadena L no se coexpresa cuando se prepara la Fc sola y, por lo tanto, este resto se sustituyó por Ser para evitar la formación de puentes disulfuro innecesarios.

[Expresión y purificación de la región extracelular de FcγRIIb]

Esto se preparó de acuerdo con el método del ejemplo 2 de referencia.

[Purificación del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb]

A 2 mg de la muestra de la región extracelular de FcγRIIb obtenida por cristalización se le añadieron 0.29 mg de Endo F1 (*Protein Science* 1996, 5: 2617-2622) expresado y purificado de *Escherichia coli* como una proteína de fusión con la glutatión *S*-transferasa. Esto se dejó reposar a temperatura ambiente durante tres días en el tampón de Bis-Tris a 0.1 M a pH 6.5 y se escindió el oligosacárido unido por N, lo que lo dejaba la *N*-acetilglucosamina unida directamente a la Asn. A continuación, esta muestra del dominio extracelular de FcγRIIb sometida al tratamiento de escisión de glúcidos se concentró por ultrafiltración con 5000 MWCO y se purificó por cromatografía de filtración en gel (Superdex200 10/300) con una columna equilibrada en HEPES a 20 mM a pH 7.5 que contiene NaCl a 0.05 M. Además, a la fracción de la región extracelular obtenida de FcγRIIb de la que se han escindido los glúcidos se le añadió la Fc(P238D) de tal forma que la relación molar de la región extracelular de FcγRIIb estuviera presente en un ligero exceso y, después de la concentración mediante ultrafiltración con 10 000 MWCO, se obtuvo una muestra del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb mediante purificación por cromatografía de filtración en gel (Superdex200 10/300) mediante una columna equilibrada en HEPES a 20 mM a pH 7.5 que contiene NaCl a 0.05 M.

[Cristalización del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb]

Una muestra del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb se concentró a aproximadamente 10 mg/ml por ultrafiltración con 10 000 MWCO y se llevó a cabo la cristalización mediante el método de difusión de vapor de gota sedente. Se utilizó Hydra II Plus One (MATRIX) para la cristalización; y para la solución del reservorio que contiene Bis-Tris a 100 mM, pH 6.5, PEG3350 al 17%, acetato de amonio a 0,2 M y D-galactosa al 2.7% (p/v), se produjo una gota de cristalización mediante el mezclado a una relación de solución de reservorio:muestra para cristalización = 0.2 µl:0.2 µl y después del sellado, se dejó reposar a 20°C y se obtuvo con éxito cristales laminados delgados.

[Medición de los datos de difracción por rayos X de un cristal del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb]

Uno de los cristales independientes obtenidos del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb se sumergió en una solución de Bis-Tris a 100 mM, pH 6.5, PEG3350 al 20%, acetato de amonio, D-galactosa al 2.7% (p/v), y etilenglicol al 22.5% (v/v). El cristal se sacó de la solución con una aguja que llevaba unida

un gancho de nilón diminuto y se congeló en nitrógeno líquido; y a continuación se midieron los datos de difracción por rayos X en una instalación de radiación de sincrotón Photon Factory BL-1A en la High Energy Accelerator Research Organization. Durante la medición, el cristal estuvo colocado constantemente en una corriente de nitrógeno a –178 °C para mantenerlo en un estado congelado, y se recogieron 225 imágenes de difracción por rayos X mediante el detector Quantum 270 CCD (ADSC) unido a una línea de haces con rotación del cristal de 0.8° cada vez. La determinación de los parámetros reticulares, la indexación de los puntos de difracción y el procesamiento de los datos de difracción a partir de las imágenes de difracción obtenidas se realizaron con el programa Xia2 (CCP4 Software Suite), XDS Package (Walfgang Kabsch) y Scala (CCP4 Software Suite); y, finalmente, se obtuvieron los datos de intensidad de difracción a una resolución de hasta 2.46 Å. El cristal pertenece al grupo espacial $P2_1$, y tiene los siguientes parámetros reticulares; a = 48.85 Å, b = 76.01 Å, c = 115.09 Å, α = 90°, β = 100.70°, γ = 90°.

[Análisis de la estructura por rayos X del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb]

Se determinó la estructura del cristal del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb mediante el método de remplazo molecular que utiliza el programa Phaser (CCP4 Software Suite). A partir del tamaño de la red cristalina obtenida y la masa molecular del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb, se predijo que el número de complejos en la unidad asimétrica era uno. A partir de las coordenadas estructurales del código de PDB 3SGJ, que es la estructura del cristal del complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIIa, las porciones de los restos aminoacídicos de las posiciones 239 a 340 de la cadena A y las posiciones 239 a 340 de la cadena B se tomaron como coordenadas independientes y se utilizaron, correspondientemente, como modelos para buscar los dominios del CH2 de Fc. Las porciones de los restos aminoacídicos de las posiciones 341 a 444 de la cadena A y de las posiciones 341 a 443 de la cadena B se tomaron como un solo conjunto de coordenadas a partir de las mismas coordenadas estructurales del código de PDB 3SGJ; y esto se utilizó como modelo para buscar los dominios CH3 de Fc. Finalmente, a partir de las coordenadas estructurales del código de PDB 2FCB, que es una estructura del cristal de la región extracelular de FcγRIIb, se tomaron las porciones de los restos aminoacídicos de las posiciones 6 a 178 de la cadena A y se utilizaron como modelo para buscar la región extracelular de FcγRIIb. La orientación y la posición de cada modelo de búsqueda en la red cristalina se determinaron para el dominio CH3 de Fc, la región extracelular de FcγRIIb y el dominio CH2 de Fc, basándose en la función de rotación y la función de translación para obtener el modelo inicial para la estructura del cristal del complejo de Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb. Cuando se llevó a cabo el refinamiento del cuerpo rígido que mueve los dos dominios CH2 de Fc, los dos dominios CH3 de Fc y la región extracelular de FcγRIIb sobre el modelo inicial obtenido, el factor de fiabilidad cristalográfica, el valor de R, llegó a ser del 40.4% y el valor de R libre llegó a ser del 41.9% para los datos de intensidad de difracción desde 25 Å a 3.0 Å en este punto. Por otra parte, el refinamiento estructural con el uso del programa Refmac5 (CCP4 Software Suite) y la revisión del modelo para observar los mapas de densidad electrónica cuyo coeficiente tiene 2Fo-Fc o Fo-Fc, que se calculan sobre la base del factor Fo estructural determinado experimentalmente, el factor Fc estructural calculado y la fase calculada con el uso del modelo, se llevaron a cabo mediante el programa Coot (Paul Emsley) y se llevó a cabo el refinamiento del modelo repitiendo estas etapas. Finalmente, como resultado de la incorporación de las moléculas de agua en el modelo basado en los mapas de densidad electrónica que utilizan 2Fo-Fc o Fo-Fc como coeficiente, y el posterior refinamiento, el factor de fiabilidad cristalográfica, los valores de R y el valor de R libre del modelo que contiene 4846 átomos que no son de hidrógeno alcanzaron el 23.7% y el 27.6% para 24 291 datos de intensidad de difracción a partir de una resolución de 25 Å a 2.6 Å, respectivamente.

[Producción de una estructura modelo del complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIb]

A partir de las coordenadas estructurales del código de PDB 3RY6, que es una estructura del cristal del complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIa, se utilizó la función Build Mutants del programa Discovery Studio 3.1 (Accelrys) para introducir mutaciones que hagan concordar la secuencia de aminoácidos de FcγRIIb con la de FcγRIIa en estas coordenadas estructurales. En ese caso, el nivel de optimización se estableció en Alto, el radio de corte se puso a 4.5, se generaron cinco modelos y el que presentó la mejor puntuación de energía entre ellos se empleó como la estructura modelo para el complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIb.

[Ejemplo 8 de referencia] Análisis de la fijación al FcγR que presentan las variantes de Fc cuyos sitios a alterar se determinaron a partir de la estructura del cristal.

A partir de los resultados del análisis de la estructura por rayos X sobre el complejo formado entre la Fc(P238D) y la región extracelular de FcγRIIb obtenida en el ejemplo 7 de referencia, se introdujeron alteraciones exhaustivas en los sitios sobre la variante de Fc que tiene la sustitución de la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp que se predijo que afectaba a la interacción con el FcγRIIb, (restos de las posiciones 233, 240, 241, 263, 265, 266, 267, 268, 271, 273, 295, 296, 298, 300, 323, 325, 326, 327, 328, 330, 332 y 334 (numeración EU)) y se evaluaron las variantes con una combinación de alteraciones que realzan la fijación al FcγRIIb.

El IL6R-B3 (SEQ ID n.º 23) se produjo mediante la introducción en el IL6R-G1d (SEQ ID n.º 19) producido en el ejemplo 4 de referencia, de la alteración producida al sustituir la Lys de la posición 439 (numeración EU) por Glu. A continuación, se produjo el IL6R-BF648 mediante la introducción en el IL6R-B3 de la alteración producida al sustituir la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp. El IL6R-L (SEQ ID n.º 21) se utilizó como la cadena L común del anticuerpo para todos los anticuerpos. Estas variantes de anticuerpo se expresaron y purificaron con el método del ejemplo 1 de referencia y la fijación a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIa de tipo H, FcγRIIa de tipo R, FcγRIIb y FcγRIIIa de tipo V) se evaluó exhaustivamente con el método del ejemplo 2 de referencia.

Se produjo una figura de acuerdo con el método que viene a continuación para los resultados de analizar las interacciones con los correspondientes FcγR. El valor de la magnitud de la fijación de cada variante a cada FcγR se dividió por el valor para la magnitud de la fijación del anticuerpo de control prealterado (IL6R-BF648/IL6R-L con la Pro de la posición 238 (numeración EU) sustituida por Asp) a cada FcγR y, a continuación, lo obtenido se multiplicó por 100 y se utilizó como el valor de actividad de fijación relativa de cada variante para cada FcγR. El eje horizontal muestra el valor relativo de la actividad de fijación de cada variante al FcγRIIb y el eje vertical muestra el valor relativo de la actividad de fijación de cada variante al FcγRIIa de tipo R (figura 29).

Tal y como se muestra en la figura 29, los resultados demuestran que, de todas las alteraciones, se hallaron 24 tipos de alteraciones que tienen un efecto de mantener o realzar la fijación al FcγRIIb en comparación con el anticuerpo prealterado. La fijación de estas variantes a cada uno de los FcγR se muestra en la tabla 23. «Alteración» en la tabla hace referencia a la alteración introducida en el IL6R-B3 (SEQ ID n.º 23; IL6R-2B999 en la tabla 23). El molde utilizado para producir el IL6R-B3, IL6R-G1d/IL6R-L, se indica con un asterisco (*).

[Tabla 23]

NOMBRE DE LA VARIANTE	ALTERACIÓN	ACTIVIDAD DE FIJACIÓN RELATIVA A FcγRIIa	ACTIVIDAD DE FIJACIÓN RELATIVA A FcγRIIaR	ACTIVIDAD DE FIJACIÓN RELATIVA A FcγRIIaH	ACTIVIDAD DE FIJACIÓN RELATIVA A FcγRIIb	ACTIVIDAD DE FIJACIÓN RELATIVA A FcγRIIIaV
IL6R-G1d/IL6R-L	*	140	650	1670	62	3348
IL6R-2B999/IL6R-L		145	625	1601	58	3264
IL6R-BF648/IL6R-L	P238D	100	100	100	100	100
IL6R-2B002/IL6R-L	P238D/E233D	118	103	147	116	147
IL6R-BP100/IL6R-L	P238D/S267A	121	197	128	110	138
IL6R-BP102/IL6R-L	P238D/S267Q	104	165	66	106	86
IL6R-BP103/IL6R-L	P238D/S267V	56	163	69	107	77
IL6R-BP106/IL6R-L	P238D/H268D	127	150	110	116	127
IL6R-BP107/IL6R-L	P238D/H268E	123	147	114	118	129
IL6R-BP110/IL6R-L	P238D/H268N	105	128	127	101	127
IL6R-BP112/IL6R-L	P238D/P271G	119	340	113	157	102
IL6R-2B128/IL6R-L	P238D/Y296D	95	87	37	103	96
IL6R-2B169/IL6R-L	P238D/V323I	73	92	83	104	94
IL6R-2B171/IL6R-L	P238D/V323L	116	117	115	113	122
IL6R-2B172/IL6R-L	P238D/V323M	140	244	179	132	144
IL6R-BP136/IL6R-L	P238D/K326A	117	159	103	119	102
IL6R-BP117/IL6R-L	P238D/K326D	124	166	96	118	105
IL6R-BP120/IL6R-L	P238D/K326E	125	175	92	114	103
IL6R-BP126/IL6R-L	P238D/K326L	113	167	132	103	146
IL6R-BP119/IL6R-L	P238D/K326M	117	181	133	110	145
IL6R-BP142/IL6R-L	P238D/K326N	98	103	97	106	102
IL6R-BP121/IL6R-L	P238D/K326Q	118	155	135	113	157
IL6R-BP118/IL6R-L	P238D/K326S	101	132	128	104	144
IL6R-BP116/IL6R-L	P238D/K326T	110	126	110	108	114
IL6R-BP911/IL6R-L	P238D/A330K	52	101	108	119	120
IL6R-BP078/IL6R-L	P238D/A330M	106	101	89	105	91
IL6R-BP912/IL6R-L	P238D/A330R	60	81	93	103	97

Los resultados de medir los valores de KD de las variantes que se muestran en la tabla 23 para FcγRIa, FcγRIIaR, FcγRIIaH, FcγRIIb y FcγRIIIa de tipo V mediante el método del ejemplo 2 de referencia se

resumen en la tabla 24. «Alteración» en la tabla hace referencia a la alteración introducida en el IL6R-B3 (SEQ ID n.º 23). El molde utilizado para producir el IL6R-B3, IL6R-G1d/IL6R-L, se indica con un asterisco (*). Por otra parte, «KD(IIaR)/KD(IIb)» y «KD(IIaH)/KD(IIb)» en la tabla representan, respectivamente, el valor obtenido al dividir el valor de KD de cada variante para FcγRIIaR entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb, y el valor obtenido al dividir el valor de KD de cada variante para FcγRIIaH entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb. «KD(IIb) del polipéptido original/KD(IIb) del polipéptido alterado» se refiere al valor obtenido al dividir el valor de KD del polipéptido original para FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb. Además, el «valor de la KD para la más fuerte de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH/valor de KD para la más fuerte de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH del polipéptido original» se muestra en la tabla 24. Aquí, polipéptido original se refiere a la variante que tiene el IL6R-B3 (SEQ ID n.º 23) como la cadena H. Se determinó que, debido a la fijación débil del FcγR a la IgG, era imposible analizar con exactitud mediante el análisis cinético y, así pues, las celdas rellenas de gris en la tabla 24 muestran los valores calculados con la ecuación 2 del ejemplo 2 de referencia.

[Ecuación 2]

$$KD = C \bullet R_{máx}/(R_{eq} - RI) - C$$

En la tabla 24 se muestra que, en comparación con el IL6R-B3 (IL6R-2B999 en la tabla 24), todas las variantes mostraban mejoras en la afinidad por el FcγRIIb y el margen de mejora era de 2.1 veces a 9.7 veces. La relación del valor de KD de cada variante para FcγRIIaR/valor de KD de cada variante para FcγRIIb, y la relación del valor de KD de cada variante para FcγRIIaH/valor de KD de cada variante para FcγRIIb representa una actividad relativa de fijación al FcγRIIb con respecto a la actividad de fijación al FcγRIIaR y la actividad de fijación al FcγRIIaH, respectivamente. Es decir, estos valores muestran el grado de selectividad de fijación de cada variante por el FcγRIIb y un mayor valor indica una selectividad de fijación más alta por el FcγRIIb. Ya que la relación del valor de KD para FcγRIIaR/valor de KD para FcγRIIb, y la relación del valor de KD para FcγRIIaH/valor de KD para FcγRIIb en el polipéptido original IL6R-B3/IL6R-L eran 0.3 y 0.2, respectivamente, todas las variantes de la tabla 24 mostraban mejoras en la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el polipéptido original. Cuando el valor de KD para la más fuerte de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH de una variante/valor de KD para la más fuerte de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH del polipéptido original es 1 o más, esto significa que la más fuerte de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH de una variante tiene una fijación equivalente o disminuida en comparación con la fijación por la más fuerte de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH que tiene el polipéptido original. Dado que este valor era de 4.6 a 34.0 para las variantes obtenidas esta vez, se puede decir que, en comparación con el polipéptido original, las variantes obtenidas esta vez tenían reducida la fijación por la más fuerte de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH. Estos resultados demostraban que, en comparación con el polipéptido original, las variantes obtenidas esta vez tenían actividades de fijación al FcγRIIa de tipo R y de tipo H mantenidas o disminuidas, realzada la actividad de fijación al FcγRIIb y mejorada la selectividad por el FcγRIIb. Por otra parte, en comparación con el IL6R-B3, todas las variantes tenían una afinidad más baja por FcγRIa y FcγRIIIaV.

[Tabla 24]

NOMBRE DE LA VARIANTE	ALTERACIÓN	KD PARA FcγRIa (mol/l)	KD PARA FcγRIIaR (mol/l)	KD PARA FcγRIIaH (mol/l)	KD PARA FcγRIIb (mol/l)	KD PARA FcγRIIIaV (mol/l)	KD(IIaR)/KD (IIb)	KD(IIaH)/KD (IIb)	KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO	VALOR DE KD PARA LA MÁS FUERTE DE LAS ACTIVIDADES DE FIJACIÓN DE UNA VARIANTE A FcγRIIaR y A FcγRIIaH/VALOR DE KD PARA LA MÁS FUERTE DE LAS ACTIVIDADES DE FIJACIÓN DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL A FcγRIIaR Y A FcγRIIaH
IL6R-G1d/IL6R-L	*	3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	0.3	1.2	0.9
IL6R-2B999/IL6R-L		4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	0.2	1.0	1.0
IL6R-BF648/IL6R-L	P238D	1.1E-08	1 5E-05	4.0E-05	1.2E-06	7.1E-05	13.0	33.9	2.6	19.9
IL6R-2B002/IL6R-L	P238D/E233D	6.4E-09	1.9E-05	8.6E-05	9.3E-07	5.3E-05	20.4	92.3	3.3	24.7
IL6R-BP100/IL6R-L	P238D/S267A	1.1E-09	7.8E-06	4.6E-05	1.1E-06	5.9E-05	7 3	42.6	2.9	10.2
IL6R-BP102/IL6R-L	P238D/S267Q	8.2E-09	8.4E-06	6.1E-05	9.0E-07	8.2E-05	9.4	67.6	3.4	11.0
IL6R-BP103/IL6R-L	P238D/S267V	3.5E-08	1.1E-05	8.8E-05	1.2E-06	1.1E-04	9.0	71.5	2.5	14.4
IL6R-BP106/IL6R-L	P238D/H268D	4.0E-09	1.1E-05	3.6E-05	9.3E-07	5.5E-05	11.6	38.7	3.3	14.0
IL6R-BP107/IL6R-L	P238D/H268E	1.5E-09	1.2E-05	5.2E-05	9.3E-07	6.3E-05	12.7	56.1	3.3	15.3
IL6R-BP110/IL6R-L	P238D/H268N	7.3E-09	1.7E-05	4.7E-05	1.5E-06	6.4E-05	11.7	31.5	2.1	22.6
IL6R-BP112/IL6R-L	P238D/P271G	6.5E-09	3.5E-06	3.5E-05	3.2E-07	6.9E-05	11.0	109.4	9.7	4.6
IL6R-2B128/IL6R-L	P238D/Y296D	1.3E-08	2.6E-05	3.4E-05	1.4E-06	7.2E-05	17.7	23.6	2.1	33.1
IL6R-2B169/IL6R-L	P238D/V323I	2.5E-08	1.9E-05	4.8E-05	1.2E-06	7.5E-05	15.8	40.7	2.6	24.3
IL6R-2B171/IL6R-L	P238D/V323L	9.1E-09	1.6E-05	3.4E-05	1.1E-06	5.7E-05	15.0	31.8	2.9	20.8
IL6R-2B172/IL6R-L	P238D/V323M	3.0E-09	6.1E-06	2.1E-05	7.7E-07	4.8E-05	8.0	27.3	4.0	8.0
IL6R-BP136/IL6R-L	P238D/K326A	6.6E-09	9.1E-06	3.8E-05	8.0E-07	6.9E-05	11.4	47.6	3.9	11.8
IL6R-BP117/IL6R-L	P238D/K326D	4.1E-09	9.2E-06	4.1E-05	8.0E-07	6.7E-05	11.6	51.4	3.9	12.0
IL6R-BP120/IL6R-L	P238D/K326E	6.6E-09	9.6E-06	6.5E-05	1.0E-06	7.9E-05	9.3	63.1	3.0	12.5
IL6R-BP126/IL6R-L	P238D/K326L	7.4E-09	1.1E-05	4.5E-05	1 4E-06	5.6E-05	7.8	31.7	2.2	14.4
IL6R-BP119/IL6R-L	P238D/K326M	7.0E-09	9.9E-06	4.5E-05	1.1E-06	5.6E-05	8.7	39.5	2.7	12.8
IL6R-BP142/IL6R-L	P238D/K326N	5.3E-09	1.8E-05	9.3E-05	1.2E-06	1.1E-04	15.5	79.5	2.6	23.5
IL6R-BP121/IL6R-L	P238D/K326Q	1.1E-08	1.3E-05	4.4E-05	1.1E-06	5.2E-05	11.7	40.4	2.8	16.6
IL6R-BP118/IL6R-L	P238D/K326S	1.2E-08	1.5E-05	4.6E-05	1.2E-06	5.6E-05	13.2	40.0	2.7	19.7
IL6R-BP116/IL6R-L	P238D/K326T	2.6E-09	1.5E-05	5.4E-05	1.1E-06	7.2E-05	13.3	48.2	2.8	19.4
IL6R-BP911/IL6R-L	P238D/A330K	4.9E-08	1.6E-05	3.7E-05	8.9E-07	5.8E-05	18.5	41.7	3.5	21.3
IL6R-BP078/IL6R-L	P238D/A330M	8.2E-09	1.5E-05	4.5E-05	1.1E-06	7.6E-05	13.4	41.3	2.8	19.0
IL6R-BP912/IL6R-L	P238Q/A330R	3.8E-08	2.6E-05	3.8E-05	1.5E-06	7.8E-05	17.8	25.9	2.1	34.0

Con respecto a las variantes prometedoras entre las variantes de combinación obtenidas, se estudiaron los factores que conducen a sus efectos con el uso de la estructura del cristal. En la figura 30 se muestra la estructura del cristal del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb. En esta figura, la cadena H colocada a la izquierda es la cadena A de la Fc, y la cadena H colocada a la derecha es la cadena B de la Fc. Aquí se puede ver que el sitio de la posición 233 (numeración EU) en la cadena A de la Fc está localizado cerca de la Lys de la posición 113 (numeración EU) del FcγRIIb. Sin embargo, en esta estructura de cristal, la cadena lateral de E233 está en una condición de movilidad considerablemente alta y su densidad electrónica no se ve bien. Por lo tanto, la alteración producida al sustituir el Glu de la posición 233 (numeración EU) por Asp conduce a la disminución en el grado de libertad de la cadena lateral, ya que la cadena lateral se convierte en una con un carbono menos. Como resultado, la pérdida de entropía al formar una interacción con la Lys de la posición 113 (numeración EU) del FcγRIIb puede disminuir y en consecuencia se especula que contribuye a la mejora de la energía libre de fijación.

De igual forma, la figura 31 muestra el entorno cerca del sitio de la posición 330 (numeración EU) en la estructura del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb. Esta figura muestra que el entorno que rodea el sitio de la posición 330 (numeración EU) de la cadena A de la Fc de Fc(P238D) es un entorno hidrófilo compuesto por la Ser de la posición 85, el Glu de la posición 86, la Lys de la posición 163 y similares (numeración EU) del FcγRIIb. Por lo tanto, se especula que la alteración producida al sustituir la Ala de la posición 330 (numeración EU) por Lys o Arg contribuye a fortalecer la interacción con la Ser de la posición 85 (numeración EU) o el Glu de la posición 86 (numeración EU) en el FcγRIIb.

En la figura 32 se representan las estructuras de la Pro de la posición 271 (numeración EU) de la cadena B de la Fc después de superponer las estructuras del cristal del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb y del complejo Fc(tipo silvestre)/región extracelular de FcγRIIIa mediante el ajuste por mínimos cuadrados basándose en las distancias de las parejas de átomos Cα respecto a la cadena B de la Fc. Estas dos estructuras casan bien, pero tienen diferentes estructura tridimensional para la Pro de la posición 271 (numeración EU). Cuando también se tiene en cuenta la débil densidad electrónica en torno a este área de la estructura del cristal del complejo Fc(P238D)/región extracelular de FcγRIIb, se sugiere que existe la posibilidad de que la Pro de la posición 271 (numeración EU) en Fc(P238D)/FcγRIIb cause una gran tensión en la estructura, lo que impide así que la estructura del lazo alcance una estructura óptima. Por lo tanto, se puede considerar que la alteración producida al sustituir la Pro de la posición 271 (numeración EU) por Gly da flexibilidad a esta estructura de lazo y contribuye al realce de la fijación al reducir la barrera energética cuando se permite formar una estructura óptima tras la interacción con el FcγRIIb.

[Ejemplo 9 de referencia] Evaluación del efecto combinatorio de las alteraciones que realzan la fijación al FcγRIIb cuando se combinan con P238D

De las alteraciones obtenidas en los ejemplos 6 y 8 de referencia, las que realzaban la fijación al FcγRIIb o mantenían la fijación al FcγRIIb y que mostraban efectos de supresión de la fijación a otros FcγR se combinaron unas con otras y se examinaron sus efectos.

Se seleccionaron alteraciones particularmente buenas de las tablas 19 y 22, y se combinaron e introdujeron en la cadena H del anticuerpo IL6R-BF648 de una manera similar al método del ejemplo 8 de referencia. Se utilizó IL6R-L como la cadena L común del anticuerpo para todos los anticuerpos, los anticuerpos se expresaron y purificaron de acuerdo con el método del ejemplo 1 de referencia, y la fijación a cada uno de los FcγR (FcγRIa, FcγRIIa de tipo H, FcγRIIa de tipo R, FcγRIIb y FcγRIIIa de tipo V) se evaluó exhaustivamente mediante el método del ejemplo 2 de referencia.

Se calculó la actividad de fijación relativa para los resultados de analizar las interacciones con los correspondientes FcγR de acuerdo con el método que viene a continuación. El valor para la magnitud de la fijación de cada variante por cada FcγR se dividió por el valor para la magnitud de la fijación del anticuerpo de control antes de la alteración (IL6R-BF648/IL6R-L con sustitución de la Pro de la posición 238 (numeración EU) por Asp) a cada FcγR y se multiplicó por 100; y a continuación se utilizó el valor como el valor de actividad relativa de fijación de cada variante a cada FcγR. El eje horizontal muestra el valor relativo de la actividad de fijación de cada variante al FcγRIIb y el eje vertical muestra el valor relativo de la actividad de fijación de cada variante al FcγRIIa de tipo R (tabla 25).

«Alteración» en la tabla hace referencia a la alteración introducida en el IL6R-B3 (SEQ ID n.º 23). El molde utilizado para producir el IL6R-B3, IL6R-G1d/IL6R-L, se indica con un asterisco (*).

[Tabla 25]

NOMBRE DE LA VARIANTE	ALTERACIÓN	ACTIVIDAD DE FIJACIÓN RELATIVA A FcgRIa	ACTIVIDAD DE FIJACIÓN RELATIVA A FcgRIIaR	ACTIVIDAD DE FIJACIÓN RELATIVA A FcgRIIaH	ACTIVIDAD DE FIJACIÓN RELATIVA A FcgRIIb	ACTIVIDAD DE FIJACIÓN RELATIVA A FcgRIIIaV
IL6R-G1d/IL6R-L	*	140	650	1670	62	3340
IL6R-B3/IL6R-L		145	625	1601	58	3284
IL6R-BF64B/IL6R-L	P238D	100	100	100	100	100
IL6R-2B253/IL6R-L	E233D/P238D/V323M	155	266	207	156	126
IL6R-2B261/IL6R-L	E233D/P238D/Y296D	100	94	91	115	87
IL6R-BP082/IL6R-L	E233D/P238D/A330K	74	126	106	136	87
IL6R-BP083/IL6R-L	P238D/Y296D/A330K	50	87	81	122	107
IL6R-BP084/IL6R-L	P238D/V323M/A330K	109	203	162	141	106
IL6R-BP085/IL6R-L	G237D/P238D/A330K	18	279	158	152	104
IL6R-BP086/IL6R-L	P238D/K326A/A330K	72	155	116	137	123
IL6R-BP087/IL6R-L	L234Y/P238D/A330K	33	163	179	137	158
IL6R-BP088/IL6R-L	G237D/P238D/K326A/A330K	25	377	166	161	122
IL6R-BP089/IL6R-L	L234Y/P238D/K326A/A330K	43	222	166	147	136
IL6R-BP128/IL6R-L	E233D/P238D/Y296D/A330K	68	111	88	138	95
IL6R-BP130/IL6R-L	E233D/P238D/V323M/A330K	104	272	224	160	115
IL6R-BP131/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/A330K	38	364	258	160	118
IL6R-BP132/IL6R-L	E233D/P238D/K326A/A330K	91	191	150	150	120
IL6R-BP133/IL6R-L	E233D/L234Y/P238D/A330K	41	174	151	137	114
IL6R-BP143/IL6R-L	L234Y/P238D/K326A	86	238	143	133	114
IL6R-BP144/IL6R-L	G237D/P238D/K326A	84	204	106	121	126
IL6R-BP145/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D	41	350	224	152	153
IL6R-BP146/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A	50	445	203	156	180
IL6R-BP147/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	24	650	562	177	209
IL6R-BP148/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	39	609	462	176	227
IL6R-BP149/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330K	29	539	401	178	186
IL6R-BP150/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A/A330R	30	757	770	183	204
IL6R-BP151/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/K326A/A330R	38	705	661	180	221
IL6R-BP152/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330R	34	638	548	178	146
IL6R-BP176/IL6R-L	E233D/P238D/K326D/A330K	102	201	128	147	131
IL6R-BP177/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330K	57	691	409	177	195
IL6R-BP178/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/P271G/A330K	51	653	259	179	110
IL6R-BP179/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	39	570	266	177	125
IL6R-BP180/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/A330K	29	602	203	179	100
IL6R-BP181/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/K326A/A330K	106	362	150	170	122
IL6R-BP182/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/Y296D/A330K	95	413	189	173	120
IL6R-BP183/IL6R-L	E233D/L234Y/P238D/P271G/K326A/A330K	83	423	181	164	113
IL6R-BP184/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/A330K	96	486	191	171	106
IL6R-BP185/IL6R-L	P238D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	47	670	446	179	191
IL6R-BP186/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/Y296D/K326A/A330K	43	614	368	175	143
IL6R-BP187/IL6R-L	L234Y/P238D/P271G/K326A/A330K	68	367	205	157	124
IL6R-BP188/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	74	686	234	178	121
IL6R-BP189/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	56	557	169	177	141
IL6R-BP190/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	50	615	224	181	155
IL6R-BP191/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	125	382	145	170	142
IL6R-BP192/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	106	406	122	172	118
IL6R-BP193/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/A330K	113	449	154	173	135
IL6R-BP194/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	69	672	385	178	249
IL6R-BP195/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330K	66	661	344	181	221
IL6R-BP196/IL6R-L	L234Y/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	89	402	185	157	137
IL6R-BP197/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330K	71	642	284	179	206
IL6R-BP198/IL6R-L	E233D/L234Y/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	104	449	188	164	157
IL6R-BP199/IL6R-L	E233D/P238D/K326D/A330R	112	172	116	144	108
IL6R-BP200/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330R	60	754	517	188	164
IL6R-BP201/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/P271G/A330R	57	696	359	186	121
IL6R-BP202/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/K326A/A330R	43	615	265	185	108
IL6R-BP203/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/A330R	35	637	255	185	86
IL6R-BP204/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/K326A/A330R	110	301	167	165	121
IL6R-BP205/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/Y296D/A330R	97	335	108	167	93
IL6R-BP206/IL6R-L	E233D/P238D/P271G/A330R	101	362	123	168	92
IL6R-BP207/IL6R-L	E233D/P238D/A330R	74	103	103	124	97
IL6R-BP208/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R	81	690	310	186	118
IL6R-BP209/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R	69	625	267	186	159
IL6R-BP210/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/A330R	57	661	279	187	135
IL6R-BP211/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R	128	312	111	165	87
IL6R-BP212/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	117	363	135	178	122
IL6R-BP213/IL6R-L	E233D/P238D/H268D/P271G/A330R	118	382	123	169	100
IL6R-BP214/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326D/A330K	36	498	265	174	165

Los resultados de medir los valores de KD de las variantes que se muestran en la tabla 25 para FcγRIa, FcγRIIaR, FcγRIIaH, FcγRIIb y FcγRIIIa de tipo V mediante el método del ejemplo 2 de referencia se resumen en la tabla 26. «Alteración» en la tabla hace referencia a la alteración introducida en el IL6R-B3 (SEQ ID n.º 23). El molde utilizado para producir el IL6R-B3, IL6R-G1d/IL6R-L, se indica con un asterisco (*). Por otra parte, «KD(IIaR)/KD(IIb)» y «KD(IIaH)/KD(IIb)» en la tabla representan, respectivamente, el valor obtenido al dividir el valor de KD de cada variante para FcγRIIaR entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb, y el valor obtenido al dividir el valor de KD de cada variante para FcγRIIaH entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb. «KD(IIb) del polipéptido original/KD(IIb) del polipéptido alterado» se refiere al valor obtenido al dividir el valor de KD del polipéptido original para FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb. Además, el «valor de KD para la más fuerte de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH/valor de KD para la más fuerte de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH del polipéptido original» se muestran en la tabla 26. Aquí, polipéptido original se refiere a la variante que tiene el IL6R-B3 (SEQ ID n.º 23) como la cadena H. Se determinó que, debido a la fijación

débil del FcγR a la IgG, era imposible analizar con exactitud mediante el análisis cinético y, así pues, las celdas rellenas de gris en la tabla 26 muestran los valores calculados con la ecuación 2 del ejemplo 2 de referencia.

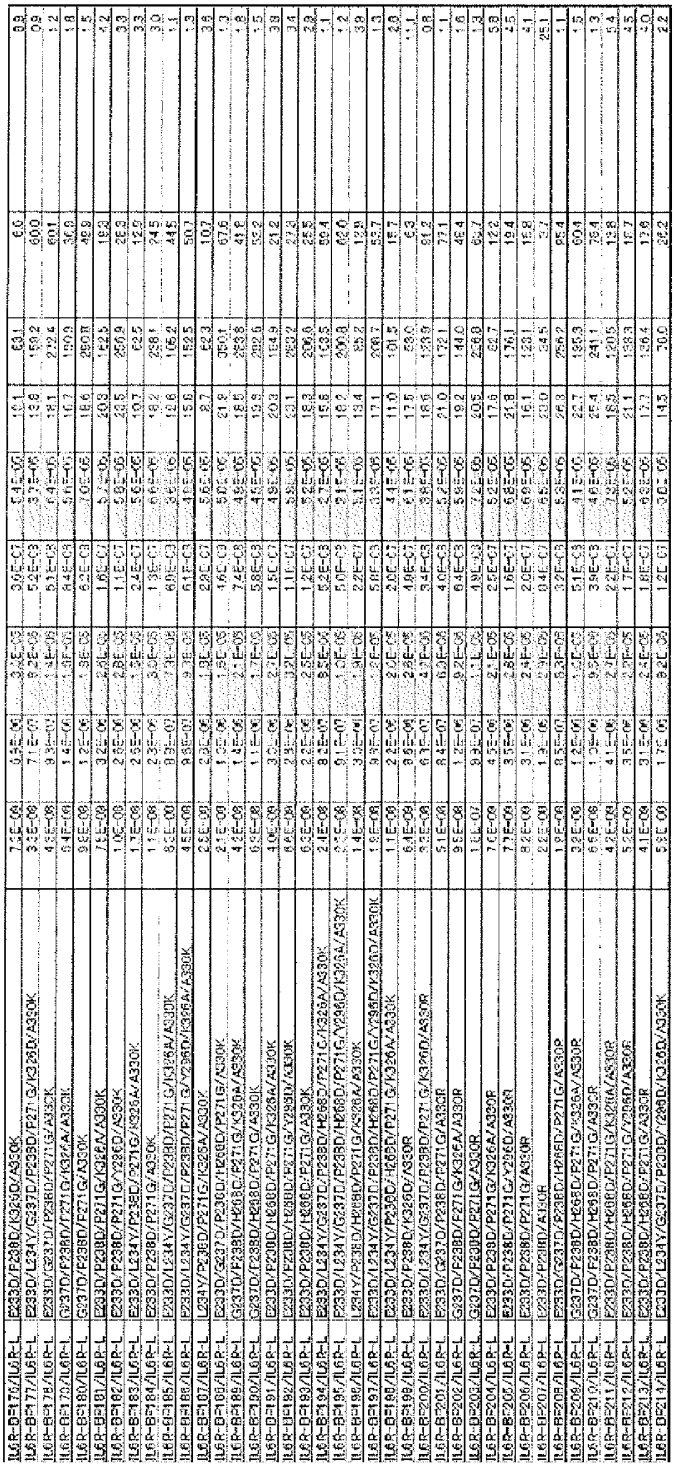
[Ecuación 2]

$$KD = C \bullet R_{máx}/(R_{eq} - RI) - C$$

En la tabla 26 se muestra que todas las variantes mejoraban su afinidad por FcγRIIb en comparación con el IL6R-B3, y el margen de mejora era de 3.0 veces a 99.0 veces. La relación del valor de KD de cada variante para FcγRIIaR/valor de KD de cada variante para FcγRIIb, y la relación del valor de KD de cada variante para FcγRIIaH/valor de KD de cada variante para FcγRIIb representa una actividad de fijación al FcγRIIb con respecto a la actividad de fijación al FcγRIIaR y la actividad de fijación al FcγRIIaH, respectivamente. Es decir, los valores muestran el grado de la selectividad de fijación de cada variante por el FcγRIIb y un mayor valor indica una selectividad de fijación más alta por el FcγRIIb. Ya que la relación del valor de KD para FcγRIIaR/valor de KD para FcγRIIb, y la relación del valor de KD para FcγRIIaH/valor de KD para FcγRIIb en el polipéptido original IL6R-B3/IL6R-L eran de 0.3 y 0.2, respectivamente, todas las variantes de la tabla 26 mostraban realzada la selectividad de fijación por el FcγRIIb en comparación con el polipéptido original. Cuando el valor de KD para la más fuerte de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH de una variante/valor de KD para la más fuerte de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH del polipéptido original es 1 o más, esto significa que la más fuerte de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH de una variante tiene una fijación equivalente o disminuida en comparación con la fijación mediante la más fuerte de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH que tiene el polipéptido original. Dado que este valor era de 0.7 a 29.9 para las variantes obtenidas esta vez, se puede decir que la fijación por la más fuerte de las actividades de fijación al FcγRIIaR y al FcγRIIaH de las variantes obtenidas esta vez era casi equivalente o disminuía en comparación con la del polipéptido original. Estos resultados demostraban que, en comparación con el polipéptido original, las variantes obtenidas esta vez tenían actividades de fijación al FcγRIIa de tipo R y de tipo H mantenidas o disminuidas, realzada la actividad de fijación al FcγRIIb y mejorada la selectividad por el FcγRIIb. Por otra parte, en comparación con IL6R-B3, todas las variantes tenían una afinidad más baja por FcγRIa y por FcγRIIIaV.

[Tabla 26]

NOMBRE DE LA VARIANTE	ALTERACIÓN	KD PARA FcgRIa (mol/l)	KD PARA FcgRIIaR (mol/l)	KD PARA FcgRIIaH (mol/l)	KD PARA FcgRIIb (mol/l)	KD PARA FcgRIIIaV (mol/l)	KD(IIaR)/ KD(IIb)	KD(IIaH)/ KD(IIb)	KD(IIb) DEL PEÉPTIDO ORIGINAL/KD(IIb) DEL PÉPTIDO ALTERADO	VALOR DE KD PARA LA MÁS FUERTE DE LAS ACTIVIDADES DE FIJACIÓN DE UNA VARIANTE A FcγRIIaR y A FcγRIIaH/VALOR DE KD PARA LA MÁS FUERTE DE LAS ACTIVIDADES DE FIJACIÓN DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL A FcγRIIaR Y A FcγRIIaH
IL6R-G1d/IL6R-L	*	3.2E-10	1.0E-06	5.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	0.2	1.2	0.9
IL6R-B9/IL6R-L	*	8.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.8E-07	0.3	0.2	1.0	1.0
IL6R-BF646/IL6R-L	P238D	1.1E-08	1.5E-06	4.0E-06	1.0E-06	2.1E-06	12.0	83.9	2.6	13.9
IL6R-BF650/IL6R-L	L233D/P238D/V323M	1.4E-08	5.0E-06	1.3E-05	4.3E-07	5.0E-06	11.5	30.1	7.2	8.5
IL6R-BF651/IL6R-L	E233D/P238D/Y296Q	5.0E-09	2.2E-06	3.3E-06	1.0E-06	7.0E-06	21.0	32.4	3.0	23.3
IL6R-BF652/IL6R-L	E233D/P238D/A330K	1.8E-08	1.2E-06	3.7E-06	5.4E-07	2.1E-06	22.8	69.0	5.8	15.5
IL6R-BF653/IL6R-L	P238D/Y296D/A330K	3.5E-08	2.3E-06	4.4E-06	7.9E-07	6.6E-06	29.0	55.5	7.9	20.9
IL6R-BF654/IL6R-L	P238D/V323M/A330K	7.0E-09	7.2E-06	2.4E-05	5.0E-07	6.2E-06	14.5	47.6	6.1	9.4
IL6R-BF655/IL6R-L	G237D/P238D/A330K	2.9E-07	4.2E-06	2.4E-05	3.2E-07	4.2E-06	13.1	74.5	9.6	9.5
IL6R-BF656/IL6R-L	P238D/K326A/A330K	2.2E-08	9.7E-06	3.4E-05	5.7E-07	5.7E-06	17.1	59.9	5.4	12.9
IL6R-BF657/IL6R-L	L234Y/P238D/A330K	3.8E-08	9.7E-06	2.1E-05	6.1E-07	4.4E-06	16.0	34.7	5.1	12.8
IL6R-BF658/IL6R-L	G237D/P238D/K326A/A330K	3.9E-07	2.9E-06	2.3E-05	2.2E-07	5.7E-06	13.3	106.6	14.0	3.7
IL6R-BF659/IL6R-L	L234Y/P238D/K326A/A330K	5.3E-08	6.4E-06	2.0E-05	3.9E-07	5.1E-06	16.6	51.9	8.0	8.1
IL6R-BF128/IL6R-L	E233D/P238D/Y296D/A330K	2.5E-08	1.5E-06	4.0E-05	5.2E-07	2.5E-06	29.8	77.6	8.0	18.6
IL6R-BF130/IL6R-L	E233D/P238D/V323M/A330K	1.0E-09	5.3E-06	2.8E-05	3.0E-07	7.1E-06	12.5	95.5	10.2	5.2
IL6R-BF131/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/A330K	1.2E-07	3.1E-06	1.4E-05	2.5E-07	5.8E-06	12.5	56.9	12.6	4.0
IL6R-BF132/IL6R-L	E233D/P238D/K326A/A330K	1.5E-08	6.0E-06	3.0E-05	3.7E-07	3.0E-06	21.5	81.1	6.4	10.2
IL6R-BF133/IL6R-L	E233D/L234Y/P238D/A330K	1.3E-07	8.6E-06	2.0E-05	5.6E-07	6.2E-06	15.5	46.8	5.6	11.2
IL6R-BF142/IL6R-L	L234Y/P238D/K326A	1.6E-08	5.7E-06	2.7E-05	5.7E-07	6.2E-06	10.0	47.1	5.4	7.5
IL6R-BF144/IL6R-L	G237D/P238D/K326A	3.7E-08	6.9E-06	3.6E-05	7.9E-07	6.5E-06	8.7	45.6	3.9	8.9
IL6R-BF145/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D	1.2E-07	3.4E-06	1.7E-05	3.4E-07	4.5E-06	9.9	49.9	9.1	5.4
IL6R-BF146/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A	7.4E-09	2.1E-06	1.9E-05	2.3E-07	3.9E-06	9.3	80.0	13.7	2.7
IL6R-BF147/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	1.4E-07	8.8E-07	3.1E-06	6.6E-08	2.3E-06	13.6	77.7	47.1	1.2
IL6R-BF148/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	5.8E-08	1.1E-06	7.0E-06	7.5E-08	8.0E-06	14.5	93.8	41.4	1.4
IL6R-BF149/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330K	1.2E-07	1.4E-06	8.4E-06	9.3E-08	9.7E-06	15.0	89.9	39.1	1.2
IL6R-BF150/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A/A330R	3.6E-07	5.5E-07	3.4E-06	3.1E-08	3.4E-06	17.2	109.0	99.0	0.7
IL6R-BF151/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/K326A/A330R	3.4E-09	6.7E-07	4.7E-06	4.0E-08	2.1E-06	16.9	117.8	77.4	0.9
IL6R-BF152/IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330R	7.9E-09	8.1E-07	5.5E-06	4.1E-08	2.6E-06	19.5	135.9	75.0	1.0



La región variable y la región constante en la secuencia de las correspondientes SEQ ID n.os se resumen en la tabla que viene a continuación. En la tabla, «B3» hace referencia a «2B999(B3)», «omlizH» hace referencia a «omalizumab_VH» y «omlizL» hace referencia a «omalizumab_VL».

[Tabla 27]

SEQ ID n.º	REGIÓN VARIABLE	REGIÓN CONSTANTE
15	GpH7	
16	GpL16	k0
17	GpH7	B3
18	IL6R	
19	IL6R	G1d
20	IL6R	IgG1-v1
21	IL6R-L	k0
22	IL6R	F11
23	IL6R	B3
24	IL6R	BP208
25	omlizH	G1d
26	omlizL	CK
27	IL6R	BP230
28	IL6R	BP264
29	IL6R	BP267
30	IL6R	G4d
31	IL6R	BP478
32	IL6R	BP253
33	IL6R	BP423
34	GpH7	G1d
35	GpH7	A5
36	IL6R	BP404
37	IL6R	BP408
38	IL6R	BP419
39	IL6R	BP407
40	IL6R	BP409
41	IL6R	BP410
42	IL6R	AP029
43		BP230
44		BP231
45		BP265
46		BP391
47		BP429
48		BP436
49		BP437
50		BP445
51		BP473
52		BP478
53		BP481
54		BP487
55		BP488
56		BP489
57		BP490
58		BP491
59		BP492
60		BP493
61		BP494
62		BP495
63		BP498
64		BP499
65		BP503
66		BP509
67		BP510
68		BP511
69	IL6R	A5
70		Fc(P587)
71		Fc(P588)
72	IL6R	P587
73	IL6R	P587-LS
74	IL6R-L2	k0
75		BP557

76		BP559
77		BP567
78		Fc(DLE)
79		Fc(YTE)
80		Fc(EF)
81		Fc(P208)

Aplicabilidad industrial

Una variante de la región Fc con realce de la actividad de fijación al FcγRIIb y realce de la selectividad de fijación al FcγRIIb en comparación con el FcγRIIa (tipo R), cuando se compara con las de un polipéptido que comprende una región Fc en la cual no se ha introducido ninguna alteración de aminoácido; y un polipéptido que comprende la variante de la región Fc. El uso del polipéptido permite la transmisión de una señal inhibidora de la respuesta inmunitaria inflamatoria dependiente de la fosforilación del ITIM de FcγRIIb. Por otra parte, al conferirle a una Fc de anticuerpo la propiedad de fijación selectiva por el FcγRIIb, se puede suprimir la producción del anticuerpo antifármaco mediante acciones inmunosupresoras dependientes de FcγRIIb.

Listado de secuencias

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Anticuerpos modificados en la región Fc específicos para Fc-gamma-RIIb

<130> C1-A1212P

<150> JP 2012-185868
<151> 2012-08-24

<160> 81

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 1125
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 1

atgtggttct tgacaactct gctcctttgg gttccagttg atgggcaagt ggacaccaca 60

aaggcagtga tcactttgca gcctccatgg gtcagcgtgt tccaagagga aaccgtaacc 120

ttgcactgtg aggtgctcca tctgcctggg agcagctcta cacagtggtt tctcaatggc 180

acagccactc agacctcgac ccccagctac agaatcacct ctgccagtgt caatgacagt 240

ggtgaataca ggtgccagag aggtctctca gggcgaagtg accccataca gctggaaatc 300

cacagaggct ggctactact gcaggtctcc agcagagtct tcacggaagg agaacctctg 360

gccttgaggt gtcatgcgtg gaaggataag ctggtgtaca atgtgcttta ctatcgaaat 420

ggcaaagcct ttaagttttt ccactggaat tctaacctca ccattctgaa aaccaacata 480

agtcacaatg gcacctacca ttgctcaggc atgggaaagc atcgctacac atcagcagga 540

atatctgtca ctgtgaaaga gctatttcca gctccagtgc tgaatgcatc tgtgacatcc 600

ccactcctgg aggggaatct ggtcaccctg agctgtgaaa caaagttgct cttgcagagg 660

cctggtttgc agctttactt ctccttctac atgggcagca agaccctgcg aggcaggaac 720

acatcctctg aataccaaat actaactgct agaagagaag actctgggtt atactggtgc 780

gaggctgcca cagaggatgg aaatgtcctt aagcgcagcc ctgagttgga gcttcaagtg 840

cttggcctcc agttaccaac tcctgtctgg tttcatgtcc ttttctatct ggcagtggga 900

ataatgtttt tagtgaacac tgttctctgg gtgacaatac gtaaagaact gaaaagaaag 960

aaaaagtggg atttagaaat ctctttggat tctggtcatg agaagaaggt aatttccagc 1020

cttcaagaag acagacattt agaagaagag ctgaaatgtc aggaacaaaa agaagaacag 1080

ctgcaggaag gggtgcaccg gaaggagccc caggggggca cgtag 1125

<210> 2
<211> 374
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
Met Trp Phe Leu Thr Thr Leu Leu Leu Trp Val Pro Val Asp Gly Gln
1               5                  10                  15

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

Val Phe Gln Glu Glu Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val Leu His Leu
        35                  40                  45

Pro Gly Ser Ser Ser Thr Gln Trp Phe Leu Asn Gly Thr Ala Thr Gln
    50                  55                  60

Thr Ser Thr Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Ser Ala Ser Val Asn Asp Ser
65                  70                  75                  80

Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Arg Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Pro Ile
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Pro Gln Gly Ala Thr
    370
```

<210> 3
<211> 951
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 3

```
atgactatgg agacccaaat gtctcagaat gtatgtccca gaaacctgtg gctgcttcaa       60

ccattgacag ttttgctgct gctggcttct gcagacagtc aagctgctcc cccaaaggct      120

gtgctgaaac ttgagccccc gtggatcaac gtgctccagg aggactctgt gactctgaca      180

tgccaggggg ctcgcagccc tgagagcgac tccattcagt ggttccacaa tgggaatctc      240

attcccaccc acacgcagcc cagctacagg ttcaaggcca acaacaatga cagcggggag      300

tacacgtgcc agactggcca gaccagcctc agcgaccctg tgcatctgac tgtgctttcc      360

gaatggctgg tgctccagac ccctcacctg gagttccagg agggagaaac catcatgctg      420

aggtgccaca gctggaagga caagcctctg gtcaaggtca cattcttcca gaatggaaaa      480

tcccagaaat tctcccattt ggatcccacc ttctccatcc cacaagcaaa ccacagtcac      540

agtggtgatt accactgcac aggaaacata ggctacacgc tgttctcatc caagcctgtg      600
accatcactg tccaagtgcc cagcatgggc agctcttcac caatgggggt cattgtggct      660

gtggtcattg cgactgctgt agcagccatt gttgctgctg tagtggcctt gatctactgc      720

aggaaaaagc ggatttcagc caattccact gatcctgtga aggctgccca atttgagcca      780

cctggacgtc aaatgattgc catcagaaag agacaacttg aagaaaccaa caatgactat      840

gaaacagctg acggcggcta catgactctg aaccccaggg cacctactga cgatgataaa      900

aacatctacc tgactcttcc tcccaacgac catgtcaaca gtaataacta a                951
```

<210> 4
<211> 316
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 5

```
atgggaatcc tgtcattctt acctgtcctt gccactgaga gtgactgggc tgactgcaag       60

tccccccagc cttggggtca tatgcttctg tggacagctg tgctattcct ggctcctgtt      120

gctgggacac ctgcagctcc cccaaaggct gtgctgaaac tcgagcccca gtggatcaac      180

gtgctccagg aggactctgt gactctgaca tgccgggggа ctcacagccc tgagagcgac      240

tccattcagt ggttccacaa tgggaatctc attcccaccc acacgcagcc cagctacagg      300

ttcaaggcca acaacaatga cagcggggag tacacgtgcc agactggcca gaccagcctc      360

agcgaccctg tgcatctgac tgtgctttct gagtggctgg tgctccagac ccctcacctg      420

gagttccagg agggagaaac catcgtgctg aggtgccaca gctggaagga caagcctctg      480

gtcaaggtca cattcttcca gaatggaaaa tccaagaaat tttcccgttc ggatcccaac      540

ttctccatcc cacaagcaaa ccacagtcac agtggtgatt accactgcac aggaaacata      600
ggctacacgc tgtactcatc caagcctgtg accatcactg tccaagctcc cagctcttca      660

ccgatgggga tcattgtggc tgtggtcact gggattgctg tagcggccat tgttgctgct      720

gtagtggcct tgatctactg caggaaaaag cggatttcag ccaatcccac taatcctgat      780

gaggctgaca aagttggggc tgagaacaca atcacctatt cacttctcat gcacccggat      840

gctctggaag agcctgatga ccagaaccgt atttag                                876
```

<210> 6
<211> 291

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

```
Met Gly Ile Leu Ser Phe Leu Pro Val Leu Ala Thr Glu Ser Asp Trp
1               5                  10                  15

Ala Asp Cys Lys Ser Pro Gln Pro Trp Gly His Met Leu Leu Trp Thr
            20                  25                  30

Ala Val Leu Phe Leu Ala Pro Val Ala Gly Thr Pro Ala Ala Pro Pro
        35                  40                  45

Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu
    50                  55                  60

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

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

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

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

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

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

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

Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly
```

180 185 190

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Ile
290

<210> 7
<211> 765
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 7
atgtggcagc tgctcctccc aactgctctg ctacttctag tttcagctgg catgcggact 60

gaagatctcc caaaggctgt ggtgttcctg gagcctcaat ggtacagggt gctcgagaag 120

gacagtgtga ctctgaagtg ccagggagcc tactcccctg aggacaattc cacacagtgg 180

tttcacaatg agagcctcat ctcaagccag gcctcgagct acttcattga cgctgccaca 240

gttgacgaca gtggagagta caggtgccag acaaacctct ccaccctcag tgacccggtg 300

cagctagaag tccatatcgg ctggctgttg ctccaggccc ctcggtgggt gttcaaggag 360

gaagacccta ttcacctgag gtgtcacagc tggaagaaca ctgctctgca taaggtcaca 420

tatttacaga atggcaaagg caggaagtat tttcatcata attctgactt ctacattcca 480

aaagccacac tcaaagacag cggctcctac ttctgcaggg ggcttgttgg gagtaaaaat 540

gtgtcttcag agactgtgaa catcaccatc actcaaggtt tgtcagtgtc aaccatctca 600

tcattctttc cacctgggta ccaagtctct ttctgcttgg tgatggtact ccttttgca 660

gtggacacag gactatattt ctctgtgaag acaaacattc gaagctcaac aagagactgg 720

aaggaccata aatttaaatg gagaaaggac cctcaagaca aatga 765

<210> 8
<211> 254
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

```
Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
1               5                  10                  15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
            20                  25                  30

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
        35                  40                  45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
    50                  55                  60

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
65                  70                  75                  80

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
    210                 215                 220
Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp
225                 230                 235                 240

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

<210> 9
<211> 702
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 9

atgtggcagc tgctcctccc aactgctctg ctacttctag tttcagctgg catgcggact 60

gaagatctcc caaaggctgt ggtgttcctg gagcctcaat ggtacagcgt gcttgagaag 120

gacagtgtga ctctgaagtg ccagggagcc tactcccctg aggacaattc cacacagtgg 180

tttcacaatg agagcctcat ctcaagccag gcctcgagct acttcattga cgctgccaca 240

gtcaacgaca gtggagagta caggtgccag acaaacctct ccaccctcag tgacccggtg 300

cagctagaag tccatatcgg ctggctgttg ctccaggccc ctcggtgggt gttcaaggag 360

gaagacccta ttcacctgag gtgtcacagc tggaagaaca ctgctctgca taaggtcaca 420

tatttacaga atggcaaaga caggaagtat tttcatcata attctgactt ccacattcca 480

aaagccacac tcaaagatag cggctcctac ttctgcaggg ggcttgttgg gagtaaaaat 540

gtgtcttcag agactgtgaa catcaccatc actcaaggtt tggcagtgtc aaccatctca 600

tcattctctc cacctgggta ccaagtctct ttctgcttgg tgatggtact ccttttgca 660

gtggacacag gactatattt ctctgtgaag acaaacattt ga 702

<210> 10
<211> 233
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Met	Trp	Gln	Leu	Leu	Leu	Pro	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Ser	Ala
1				5				10					15		

Gly	Met	Arg	Thr	Glu	Asp	Leu	Pro	Lys	Ala	Val	Val	Phe	Leu	Glu	Pro
		20					25					30			

Gln	Trp	Tyr	Ser	Val	Leu	Glu	Lys	Asp	Ser	Val	Thr	Leu	Lys	Cys	Gln
		35					40					45			

Gly	Ala	Tyr	Ser	Pro	Glu	Asp	Asn	Ser	Thr	Gln	Trp	Phe	His	Asn	Glu
	50					55					60				

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile
225 230

<210> 11
<211> 330
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 11
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

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

```
        35                  40                  45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
        275                 280                 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300

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

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

<210> 12
<211> 326

<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
```

```
                165                 170                 175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                325
```

<210> 13
<211> 377
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 13

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

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

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

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

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

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

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
            100                 105                 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
        115                 120                 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
    130                 135                 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145                 150                 155                 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
                165                 170                 175

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

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

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

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

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

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

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

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

290 295 300

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 14
<211> 327
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 14
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

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> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser
        115
```

<210> 16
<211> 219
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

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

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 17
<211> 443
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 17
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Gln Asp Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

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

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 18
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 18
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19

<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 19

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175
```

```
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 20
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 20

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190
```

```
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Asp
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435                 440                 445
```

<210> 21
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 21

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145                 150                 155                 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                165                 170                 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
            180                 185                 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
        195                 200                 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 22
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 22

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190
```

```
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

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

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Tyr His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 23
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 23

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205
```

```
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 24
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 24

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220
```

```
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Asp Leu Leu Gly Asp Asp
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp
            260                 265                 270

Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Arg Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 25
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 25

```
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 Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
            20                  25                  30

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

Val Ala Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val Trp Gly
            100                 105                 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
        115                 120                 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
    130                 135                 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145                 150                 155                 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
                165                 170                 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
            180                 185                 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
        195                 200                 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
    210                 215                 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225                 230                 235                 240
```

```
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
                245                 250                 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
            260                 265                 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
        275                 280                 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
    290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305                 310                 315                 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
                325                 330                 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
            340                 345                 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
        355                 360                 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
    370                 375                 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385                 390                 395                 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
                405                 410                 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
            420                 425                 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
        435                 440                 445

Pro
```

<210> 26
<211> 218
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 26

```
Asp Ile Gln Leu 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 Ser Val Asp Tyr Asp
            20                  25                  30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
        35                  40                  45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
    50                  55                  60

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His
                85                  90                  95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105                 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
        115                 120                 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
    130                 135                 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145                 150                 155                 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
                165                 170                 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
            180                 185                 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
        195                 200                 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 27
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 27

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220
```

```
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Asp Leu Leu Gly Asp Asp
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp
            260                 265                 270

Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Asp Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Arg Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 28
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 28

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Asp Leu Leu Gly Asp Asp
225                 230                 235                 240
```

```
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Glu Asp
            260                 265                 270

Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Asp Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Arg Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 29
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 29

```
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
```

```
1               5                   10                  15

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Asp Leu Leu Gly Asp Asp
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255
```

```
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Glu Asp
            260                 265                 270

Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 30
<211> 444
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 30

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
```

```
            20                  25                  30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

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

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225                 230                 235                 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270
```

Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435 440

<210> 31
<211> 444
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 31
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp

```
        35                  40                  45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

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

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro
    210                 215                 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Asp Leu Leu Gly Asp Asp Ser Val Phe
225                 230                 235                 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Asp Gly Glu Val
            260                 265                 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285
```

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Asp Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Arg Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 32
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 32
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu

```
    50                  55                  60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300
```

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 33
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 33
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

```
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Asp Leu Leu Gly Asp Asp
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ala Glu Glu Asp
            260                 265                 270

Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320
```

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Arg Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 34
<211> 443
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 34
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

```
                85                  90                  95

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

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
    130                 135                 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145                 150                 155                 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
                165                 170                 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
            180                 185                 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
        195                 200                 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
    210                 215                 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225                 230                 235                 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
                245                 250                 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
            260                 265                 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
        275                 280                 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
    290                 295                 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305                 310                 315                 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
                325                 330                 335
```

```
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
            340                 345                 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
        355                 360                 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
    370                 375                 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385                 390                 395                 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
                405                 410                 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
            420                 425                 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440
```

<210> 35
<211> 443
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 35

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

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

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

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

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

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

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
```

```
            100                 105                 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
    130                 135                 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145                 150                 155                 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
                165                 170                 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
            180                 185                 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
        195                 200                 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
    210                 215                 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225                 230                 235                 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
                245                 250                 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
            260                 265                 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
        275                 280                 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
    290                 295                 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305                 310                 315                 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
                325                 330                 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
            340                 345                 350
```

Arg Lys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 36
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 36
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

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

```
        115                 120                 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Asp Tyr Leu Gly Asp Asp
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Glu Asp
            260                 265                 270

Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Asp Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Arg Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365
```

```
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 37
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 37

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
```

```
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Asp Leu Gln Gly Asp Asp
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Glu Asp
            260                 265                 270

Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Asp Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Arg Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 38
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 38

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
```

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Asp Leu Phe Gly Asp Asp
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Glu Asp
260 265 270

Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Asp Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Arg Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 39
<211> 447

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 39

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
```

```
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Asp Leu Asp Gly Asp Asp
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Glu Asp
            260                 265                 270

Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Asp Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Arg Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 40
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 40

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
```

```
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Asp Leu Glu Gly Asp Asp
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Glu Asp
            260                 265                 270

Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Asp Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Arg Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 41
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 41

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
```

```
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Asp Leu Thr Gly Asp Asp
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Glu Asp
            260                 265                 270

Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Asp Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Arg Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 42
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 42

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
```

```
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Asp Leu Leu Gly Asp Asp
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Glu Asp
            260                 265                 270

Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Asp Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Arg Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 43
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 43

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

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

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu 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 Asp Leu Leu Gly Asp Asp 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 Asp Glu Asp Gly 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 Asp 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 Arg 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 44
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 44
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 Asp Asp 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 Asp Glu Asp Gly 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 Asp 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 Arg 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 45
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 45

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val 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 Asp Asp 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 Glu Glu Asp Gly 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 Asp 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 Arg 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 46
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 46

```
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 Asp Leu Leu Gly Asp Asp 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 Asp Glu Asp Gly 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 Asp 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 Arg Pro Thr 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 47
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 47

```
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 Asp Leu Leu Gly Asp Asp 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 Ile Asp Val Gly Glu Glu Asp Gly 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 Arg 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 48
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 48
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 Asp Leu Leu Gly Asp Asp 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 Ala Glu Glu Asp Gly 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 Asp 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 Arg Pro Thr 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 49
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 49

```
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 Asp Asp 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 Ala Glu Glu Asp Gly 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 Asp 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 Arg Pro Thr 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 50
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 50

```
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 Asp Leu Leu Gly Asp Asp 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 Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly 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 Arg 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 51
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 51

```
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 Asp Leu Leu Gly Asp Asp 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 Asp Glu Asp Gly 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 Asp 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 Gly Leu Pro Arg 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 52
<211> 325
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 52
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 Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Asp Leu Leu Gly Asp Asp 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 Asp Glu Asp Gly Glu Val Lys 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 Asp
                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 Ala Leu
        195                 200                 205

Pro Arg Pro 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 Arg Asp Glu Leu 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 Gln Gly Asn Val Phe Ser
    290                 295                 300

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

Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 53
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 53

```
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 Asp Leu Leu Gly Asp Asp 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 Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 54
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 54

```
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 Asp Leu Leu Gly Asp Asp 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 Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly 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 Arg 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 Met 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 55
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 55

```
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 Asp Leu Leu Gly Asp Asp 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 Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly 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 Asp 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 Arg 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 56
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 56

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Pro Asp Leu Leu Gly Asp Asp 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 Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly 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 Asp 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 Arg 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 Met 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 57
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 57

```
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 Asp Asp 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 Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly 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 Arg 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 58
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 58

```
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 Asp Asp 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 Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly 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 Asp 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 Arg 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 59
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 59

```
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 Asp 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 Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 60
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 60
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 Asp 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 Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly 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 Asp 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 61
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 61

```
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 Asp Asp 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 Ala Glu Glu Asp Gly 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 Asp 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 Arg 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 62
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 62

```
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 Asp Asp 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 Gly Glu Glu Asp Gly 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 Asp 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 Arg 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 63
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 63

```
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 Asp Leu Leu Gly Asp Asp 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 Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly 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 Arg 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 Leu 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 64
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 64

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Pro Asp Leu Leu Gly Asp Asp 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 Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly 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 Asp 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 Arg 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 Leu 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 65
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 65

```
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 Asp Leu Leu Gly Asp Asp 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 Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly 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 Asp 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 Gly Leu Pro Arg 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 Met 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 66
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 66

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Pro Asp Leu Leu Gly Asp Asp 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 Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly Asp 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 Asp 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 67
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 67
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Asp Asp 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 Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly Pro 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 Arg 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 68
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 68

```
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 Asp Asp 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 Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly Pro 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 Asp 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 Arg 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 69
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 69

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
            20                  25                  30
```

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285
```

```
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
                325                 330                 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
            340                 345                 350

Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
        355                 360                 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
    370                 375                 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385                 390                 395                 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
                405                 410                 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
            420                 425                 430

Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 70
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 70

```
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 Asp Leu Leu Gly Gly Asp 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 Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
    290                 295                 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305                 310                 315                 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 71
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 71

```
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 Asp 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 Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 72
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 72

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Asp Leu Leu Gly Gly Asp
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp
            260                 265                 270

Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300
```

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 73
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 73
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

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

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

```
Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
    130                 135                 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145                 150                 155                 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
                165                 170                 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
            180                 185                 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
        195                 200                 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
    210                 215                 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Asp Leu Leu Gly Gly Asp
225                 230                 235                 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
                245                 250                 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp
            260                 265                 270

Gly Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
        275                 280                 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
    290                 295                 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305                 310                 315                 320
```

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu
420 425 430

Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 74
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 74
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 75
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 75
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 Asp Asp 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 Gly Asp Glu Asp Gly 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 Asp 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 Arg 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 76
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 76

```
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 Asp 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 Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly Asp 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 Asp 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 77
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 77
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 Asp Leu Leu Gly Gly Asp 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 Ile Asp Val Ala Glu Glu Asp Gly 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 Asp 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 Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
            325
```

<210> 78
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 78

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 79
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 79

```
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 Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys
    130                 135                 140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 80
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 80

```
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 Glu 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 Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
    210                 215                 220

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

<210> 81
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia generada artificialmente

<400> 81

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
                325
```

REIVINDICACIONES

1. Una región Fc de la IgG1 de humano que comprende cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos de (a) a (x):

(a) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(b) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp o Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(c) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 332 es Thr, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(d) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Gly o Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(e) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 332 es Thr, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(f) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 332 es Thr, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(g) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 268 es Asp, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 327 es Gly, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(h) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, y el aminoácido de la posición 271 es Gly, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(i) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(j) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 396 es Met o Leu, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(k) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(l) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la

posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(m) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, y el aminoácido de la posición 271 es Gly, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(n) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, y el aminoácido de la posición 296 es Asp, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(o) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 267 es Ala o Gly, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(p) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 396 es Met o Leu, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(q) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, el aminoácido de la posición 327 es Gly, el aminoácido de la posición 330 es Arg, y el aminoácido de la posición 396 es Met, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(r) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 272 es Asp, y el aminoácido de la posición 296 es Asp, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(s) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 272 es Pro, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(t) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 272 es Pro, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(u) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, y el aminoácido de la posición 271 es Gly, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(v) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 237 es Asp, el aminoácido de la posición 267 es Gly, el aminoácido de la posición 268 es Asp, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 296 es Asp, y el aminoácido de la posición 330 es Arg, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc;

(w) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, el aminoácido de la posición 272 es Asp, y el aminoácido de la posición 296 es Asp, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc; y

(x) una secuencia de aminoácidos en la que el aminoácido de la posición 238 es Asp, el aminoácido de la posición 233 es Asp, el aminoácido de la posición 264 es Ile, el aminoácido de la posición 267 es Ala, el aminoácido de la posición 268 es Glu, el aminoácido de la posición 271 es Gly, y el aminoácido de la posición 296 es Asp, de acuerdo con la numeración EU, en una región Fc,

en donde (i) el valor para [valor de KD para el FcγRIIa (tipo R) de un polipéptido que comprende dicha región Fc de la IgG1 de humano]/[valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende dicha

región Fc de la IgG1 de humano] es 10.0 o mayor, y (ii) el valor para [valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende una región Fc de SEQ ID n.º 11]/[valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende dicha región Fc de la IgG1 de humano] es 15.0 o más.

2. La región Fc de la IgG1 de humano de la reivindicación 1, en donde el valor para [valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende una región Fc de SEQ ID n.º 11]/[valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende dicha región Fc de la IgG1 de humano] es 50.0 o más, o 100.0 o más.

3. La región Fc de la IgG1 de humano de la reivindicación 1 o 2, en donde el valor para [valor de KD para el FcγRIIa (tipo R) de un polipéptido que comprende dicha región Fc de la IgG1 de humano]/[valor de KD para el FcγRIIb de un polipéptido que comprende dicha región Fc de la IgG1 de humano] es 20.0 o mayor.

4. La región Fc de la IgG1 de humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que consiste en cualquier secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID n.os 43 a 68, SEQ ID n.º 70, SEQ ID n.º 71 y las SEQ ID n.os 75 a 77.

5. Un polipéptido que comprende al menos dos regiones Fc de la IgG1 de humano de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las dos regiones Fc de la IgG1 de humano están asociadas.

6. El polipéptido de la reivindicación 5, en donde la secuencia de aminoácidos de las dos regiones Fc de la IgG1 de humano asociadas en el polipéptido son (a) iguales o (b) diferentes.

7. El polipéptido de la reivindicación 6(b), en donde la secuencia de aminoácidos de las dos regiones Fc de la IgG1 de humano asociadas tienen diferentes aminoácidos en al menos una posición aminoacídica seleccionada de las posiciones 235, 236, 237, 238 y 239 de acuerdo con la numeración EU en la región Fc de la IgG1 de humano.

8. El polipéptido de la reivindicación 7, en donde una de las secuencias de aminoácidos de las dos regiones Fc de la IgG1 de humano asociadas es una secuencia de aminoácidos que comprende al menos un aminoácido seleccionado de Asp, Gln, Glu o Thr en la posición del aminoácido 235, Asn en la posición del aminoácido 236, Phe o Trp en la posición del aminoácido 237, Glu, Gly, o Asn en la posición del aminoácido 238, y Asp o Glu en la posición del aminoácido 239 de acuerdo con la numeración EU.

9. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde el polipéptido que comprende las regiones Fc de la IgG1 de humano es un anticuerpo de tipo IgG o una molécula de la proteína de fusión a Fc.

10. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9.

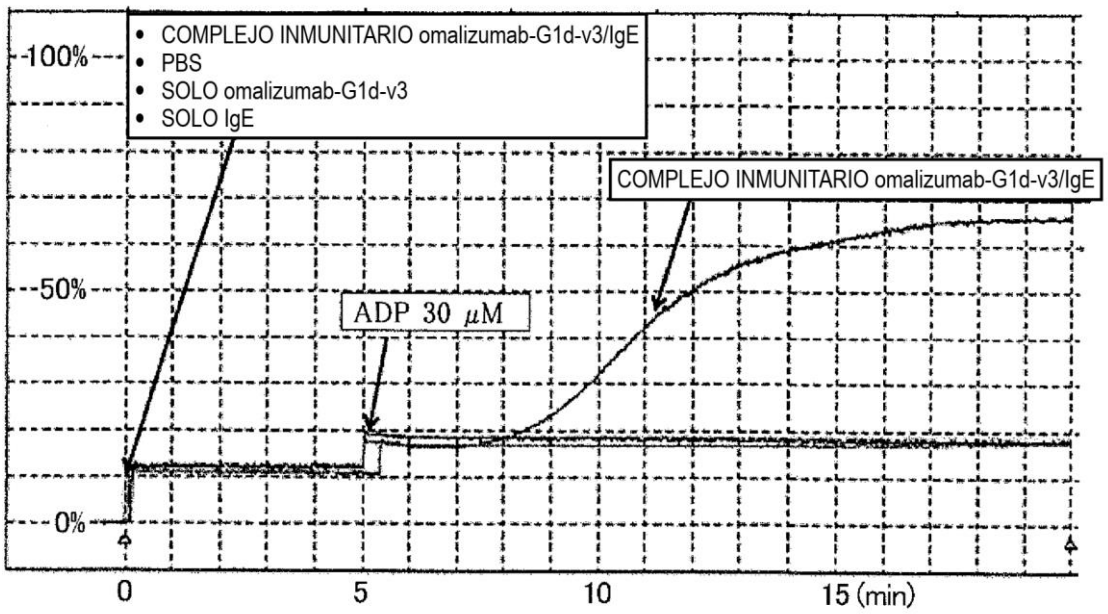

• COMPLEJO INMUNITARIO omalizumab-G1d-v3/IgE
• PBS
• SOLO omalizumab-G1d-v3
• SOLO IgE
100%
50%
0%
ADP 30 μM
COMPLEJO INMUNITARIO omalizumab-G1d-v3/IgE
0
5
10
15 (min)

FIG. 1

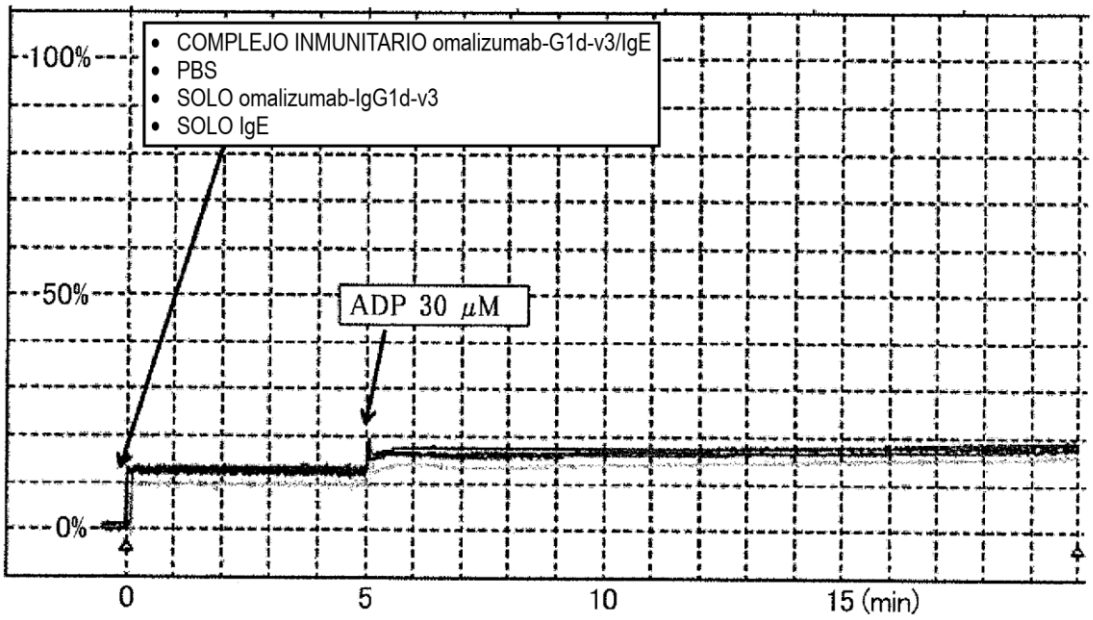

COMPLEJO INMUNITARIO omalizumab-G1d-v3/IgE
PBS
SOLO omalizumab-IgG1d-v3
SOLO IgE
100%
50%
0%
ADP 30 μM
0
5
10
15 (min)

FIG. 2

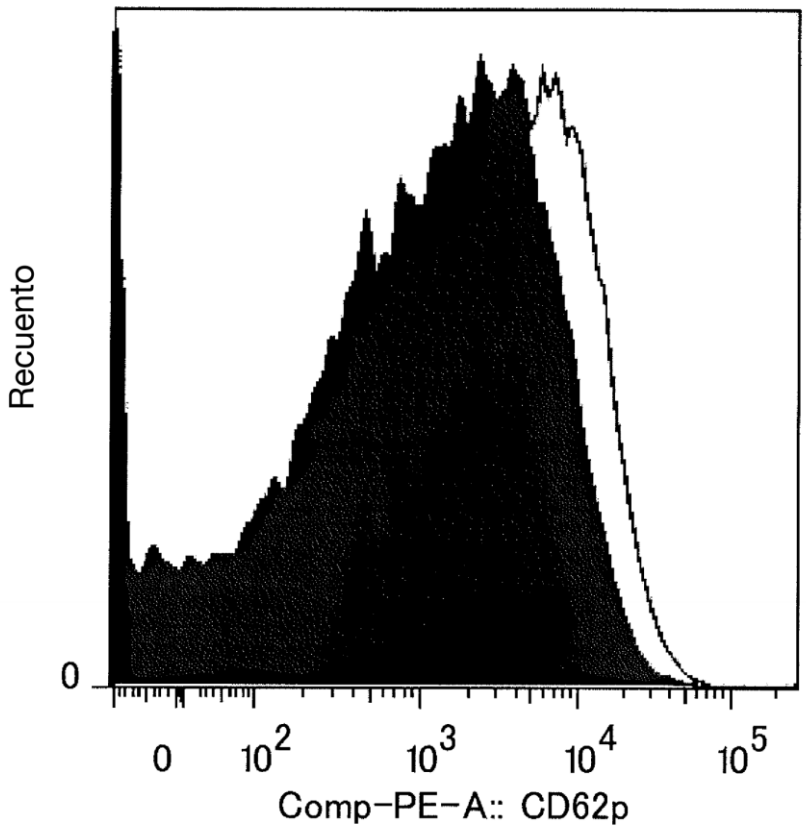


FIG. 3

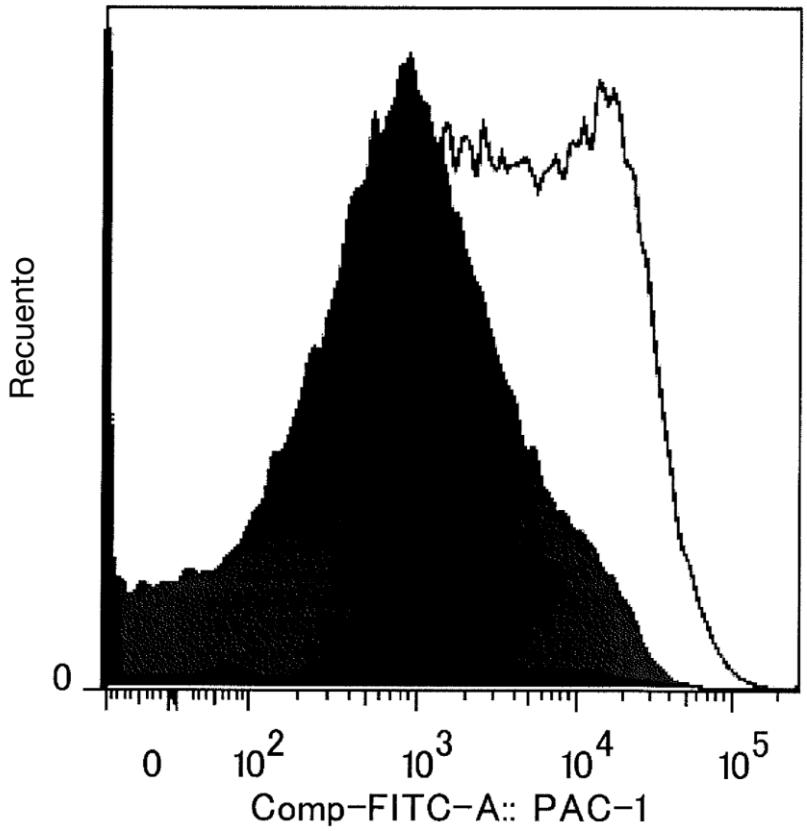


FIG. 4

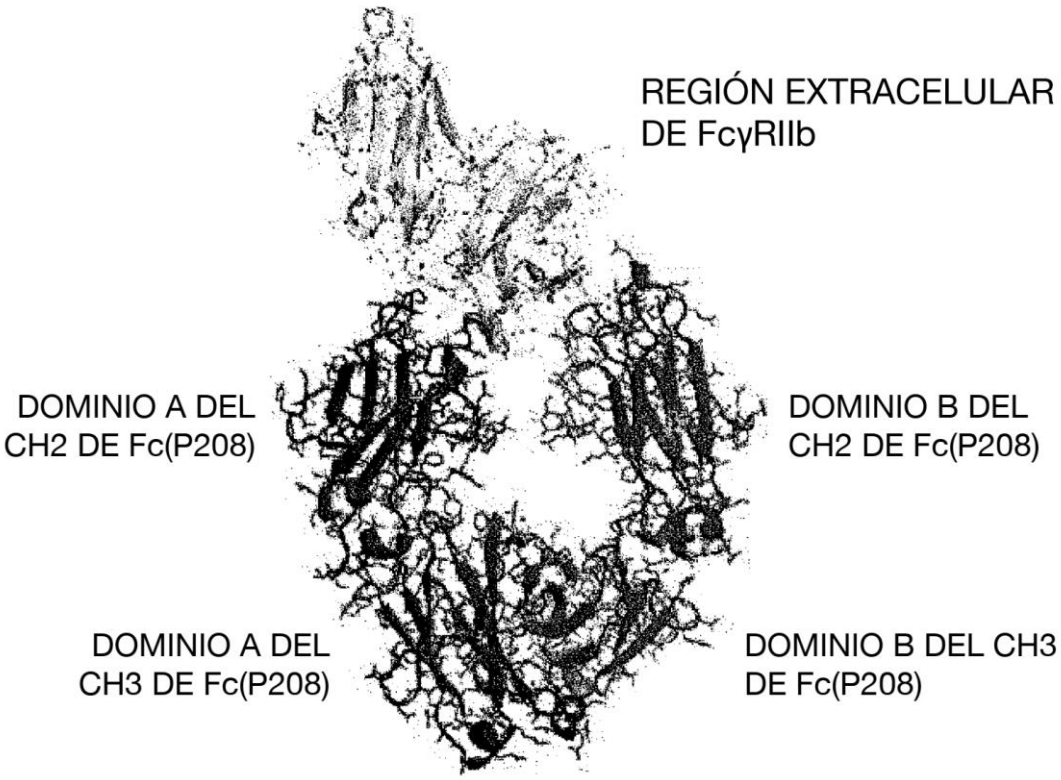
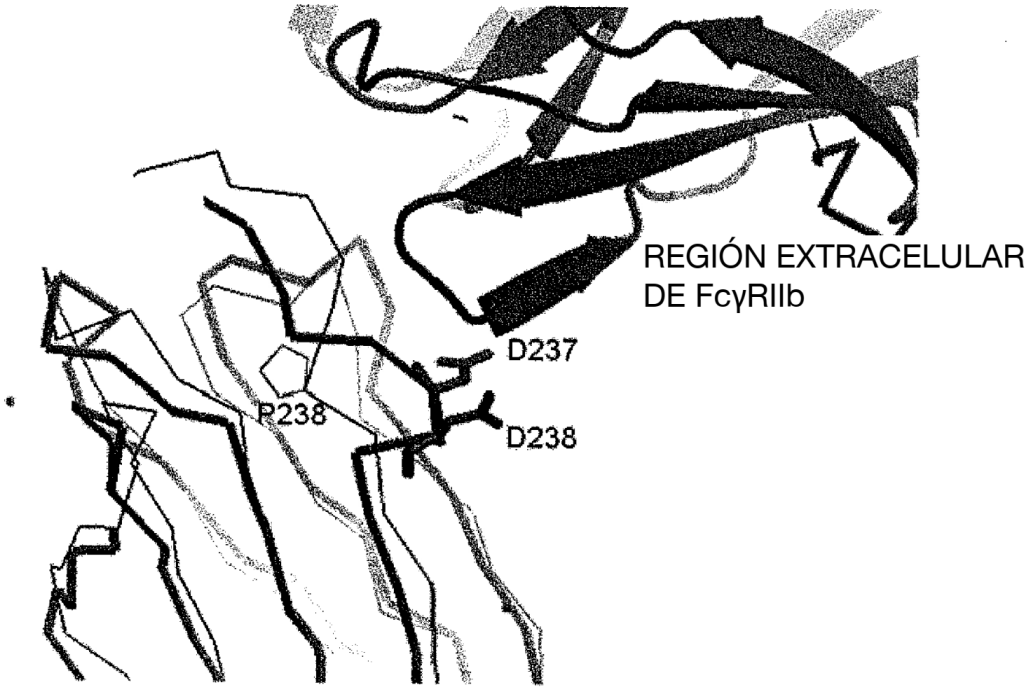

REGIÓN EXTRACELULAR
DE FcγRIIb
DOMINIO A DEL
CH2 DE Fc(P208)
DOMINIO B DEL
CH2 DE Fc(P208)
DOMINIO A DEL
CH3 DE Fc(P208)
DOMINIO B DEL CH3
DE Fc(P208)

FIG. 5



LÍNEA FINA: DOMINIO A DEL CH2 DE Fc(tipo silvestre)
LÍNEA GRUESA: DOMINIO A DEL CH2 DE Fc(P208)

FIG. 6

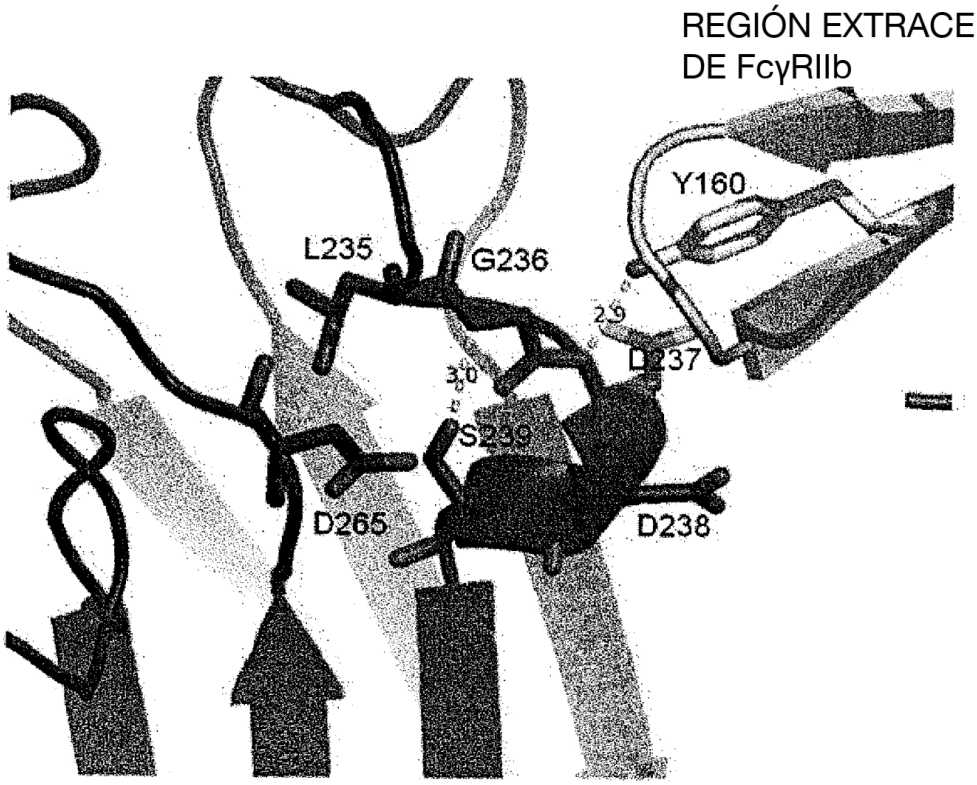

REGIÓN EXTRACELULAR
DE FcγRIIb
Y160
L235
G236
2.9
D237
3.0
S239
D265
D238
DOMINIO A DEL CH2
DE Fc(P208)

FIG. 7

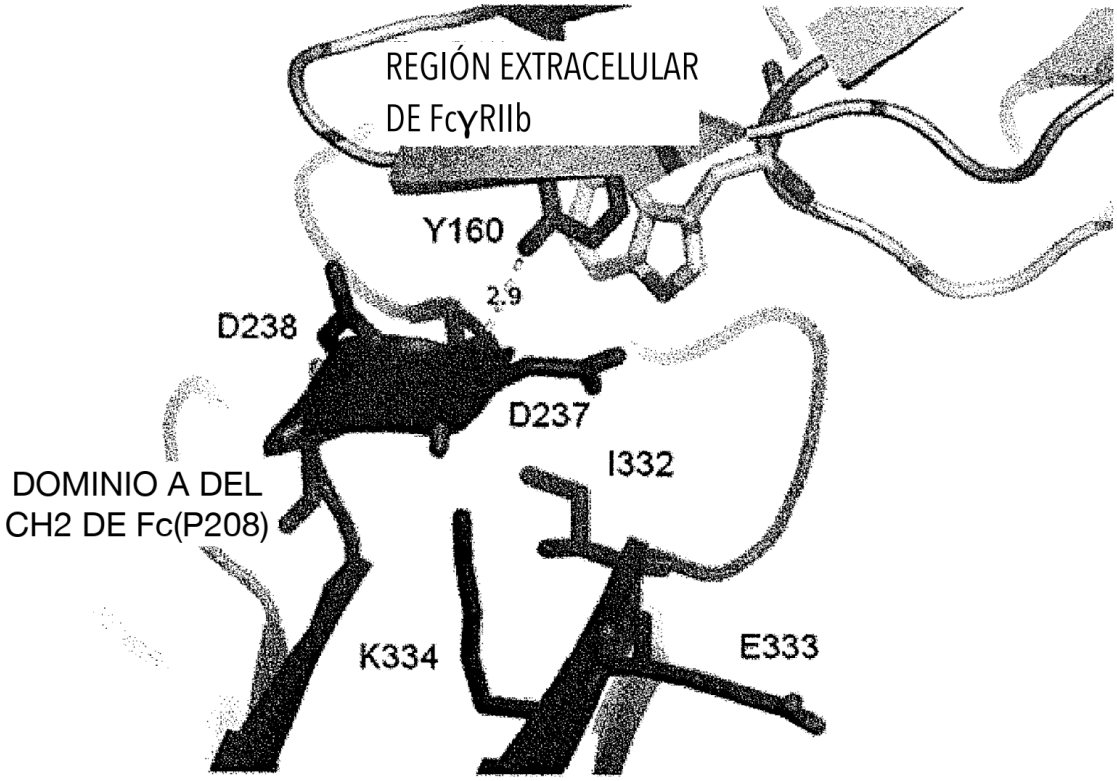
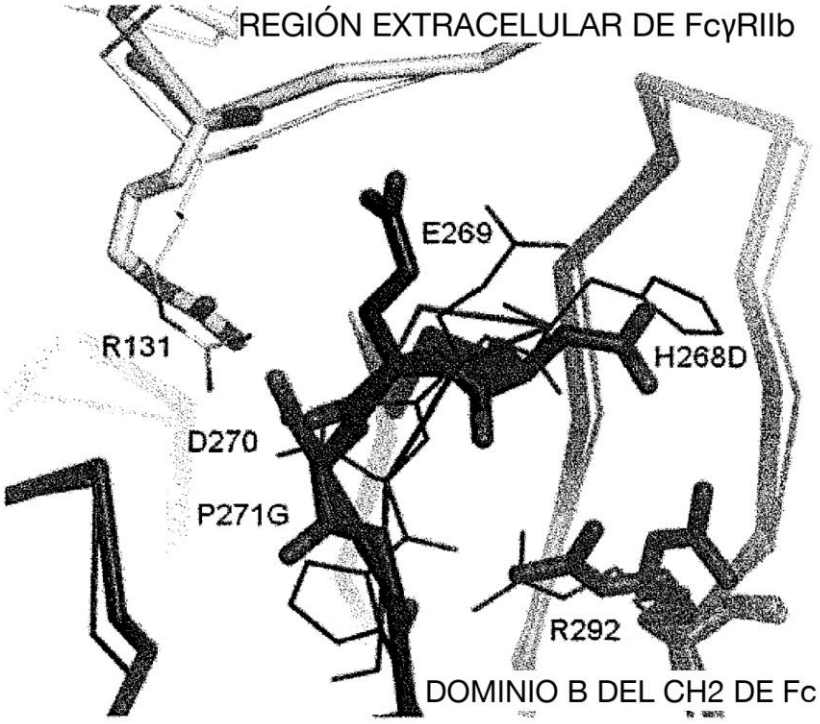
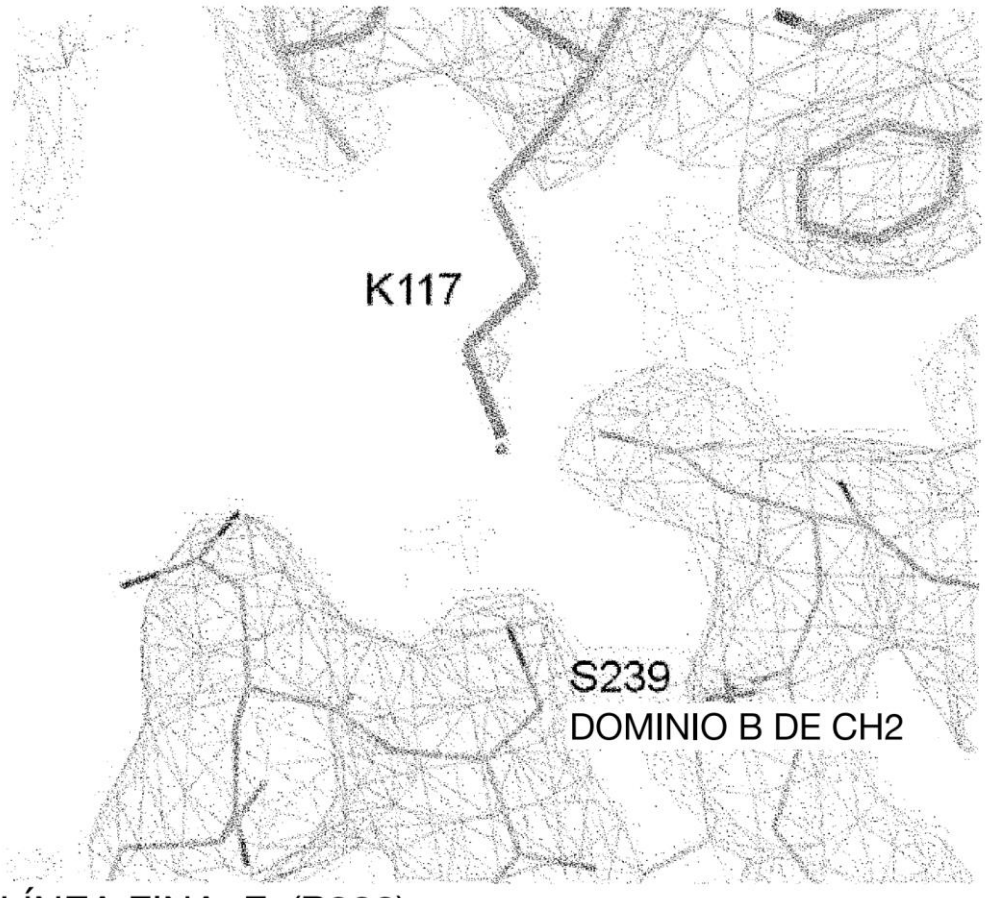

REGIÓN EXTRACELULAR
DE FcγRIIb
Y160
2.9
D238
D237
I332
DOMINIO A DEL
CH2 DE Fc(P208)
K334
E333

FIG. 8



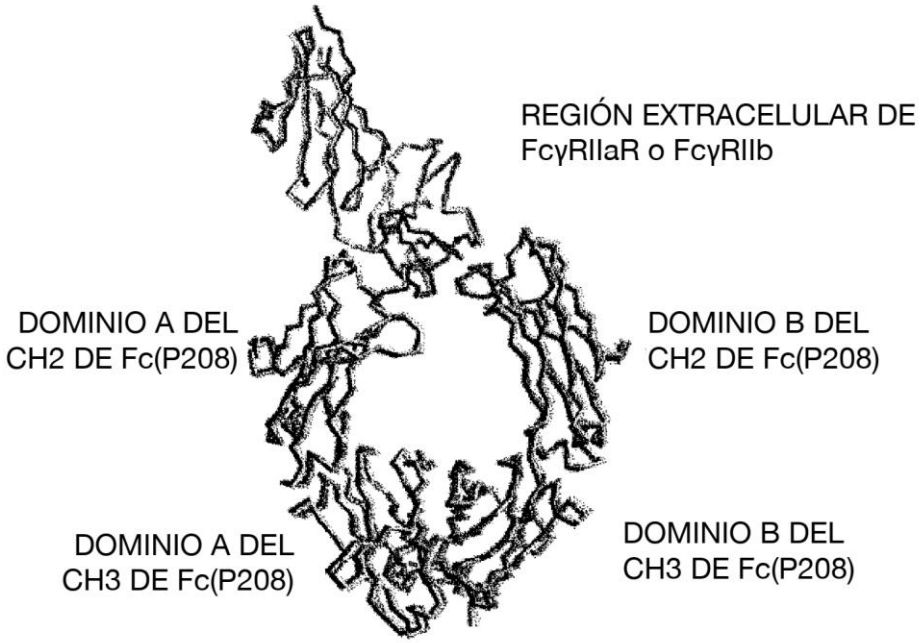
LÍNEA FINA: ESTRUCTURA DEL CRISTAL POR RAYOS X DEL COMPLEJO Fc(P238D)/REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIb
LÍNEA GRUESA: ESTRUCTURA DEL CRISTAL POR RAYOS X DEL COMPLEJO Fc(P208)/REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIb

FIG. 9



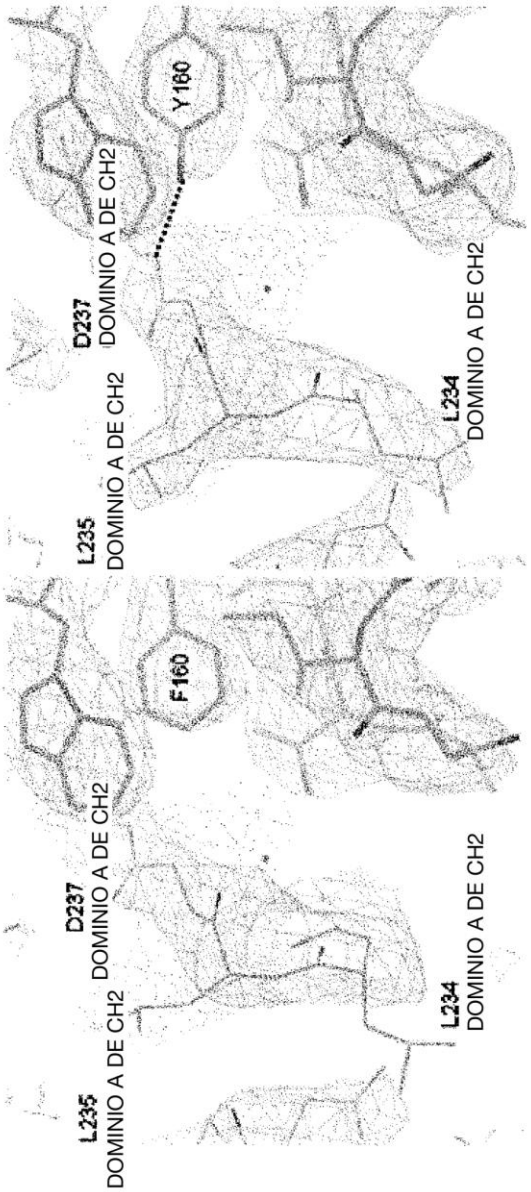
LÍNEA FINA: Fc(P208)
LÍNEA GRUESA: REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIb

FIG. 10



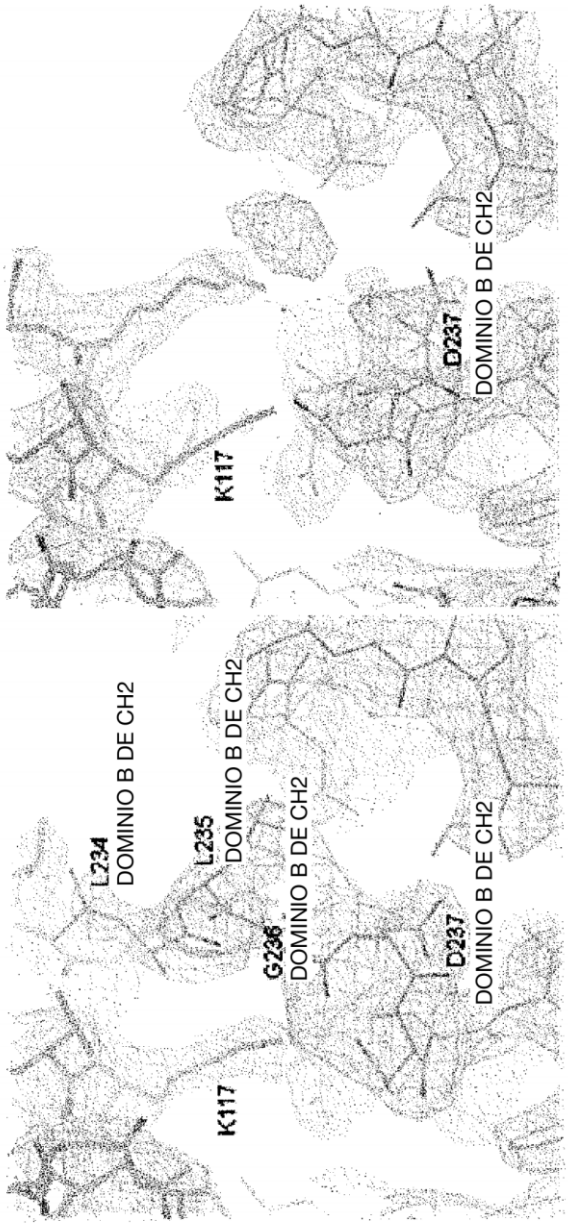
NEGRO: ESTRUCTURA DEL CRISTAL POR RAYOS X DEL COMPLEJO Fc(P208)/REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIaR
GRIS: ESTRUCTURA DEL CRISTAL POR RAYOS X DEL COMPLEJO Fc(P208)/REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIb

FIG. 11



LÍNEA FINA: Fc(P208)
LÍNEA GRUESA: REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIaR o FcγRIIb
IZQUIERDA: ESTRUCTURA DEL CRISTAL POR RAYOS X DEL COMPLEJO Fc(P208)/REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIaR
DERECHA: ESTRUCTURA DEL CRISTAL POR RAYOS X DEL COMPLEJO Fc(P208)/REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIb

FIG. 12



LÍNEA FINA: Fc(P208)
LÍNEA GRUESA: REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIaR o FcγRIIb
IZQUIERDA: ESTRUCTURA DEL CRISTAL POR RAYOS X DEL COMPLEJO Fc(P208)/REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIaR
DERECHA: ESTRUCTURA DEL CRISTAL POR RAYOS X DEL COMPLEJO Fc(P208)/REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIb

FIG. 13

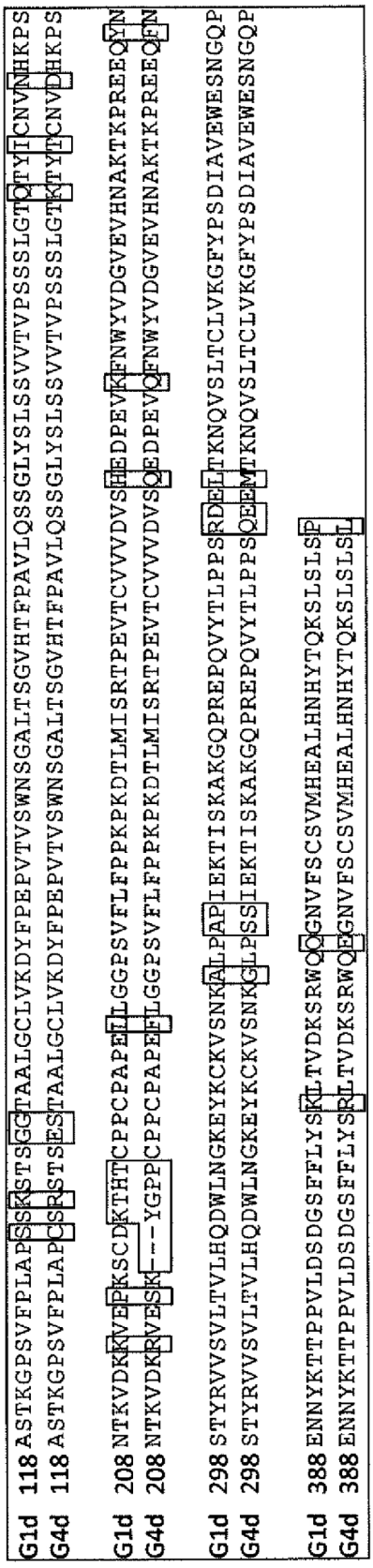

G1d 118 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
G4d 118 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPS
G1d 208 NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
G4d 208 NTKVDKRVESK---YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
G1d 298 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
G4d 298 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
G1d 388 ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
G4d 388 ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSL

FIG. 14

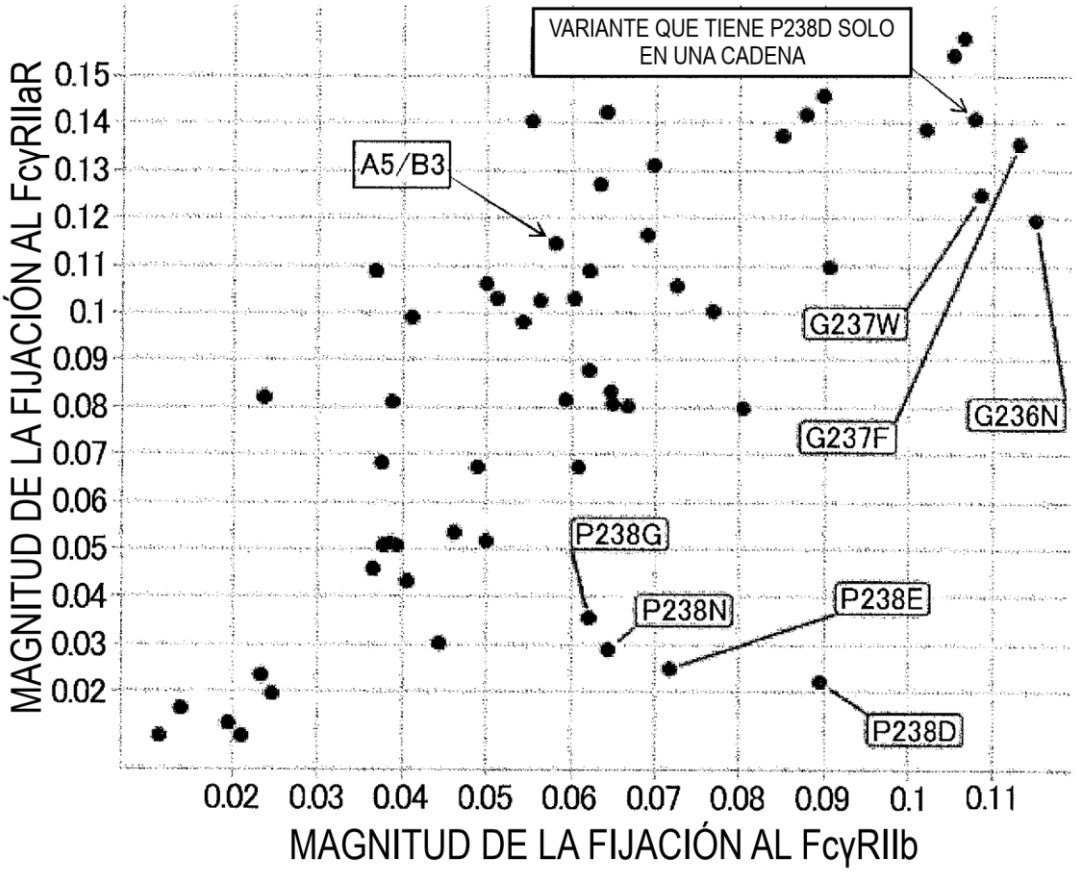

VARIANTE QUE TIENE P238D SOLO EN UNA CADENA
A5/B3
G237W
G237F
G236N
P238G
P238N
P238E
P238D
MAGNITUD DE LA FIJACIÓN AL FcγRIIaR
MAGNITUD DE LA FIJACIÓN AL FcγRIIb
0.15
0.14
0.13
0.12
0.11
0.1
0.09
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.02 0.03 0.04 0.05 0.06 0.07 0.08 0.09 0.1 0.11

FIG. 15

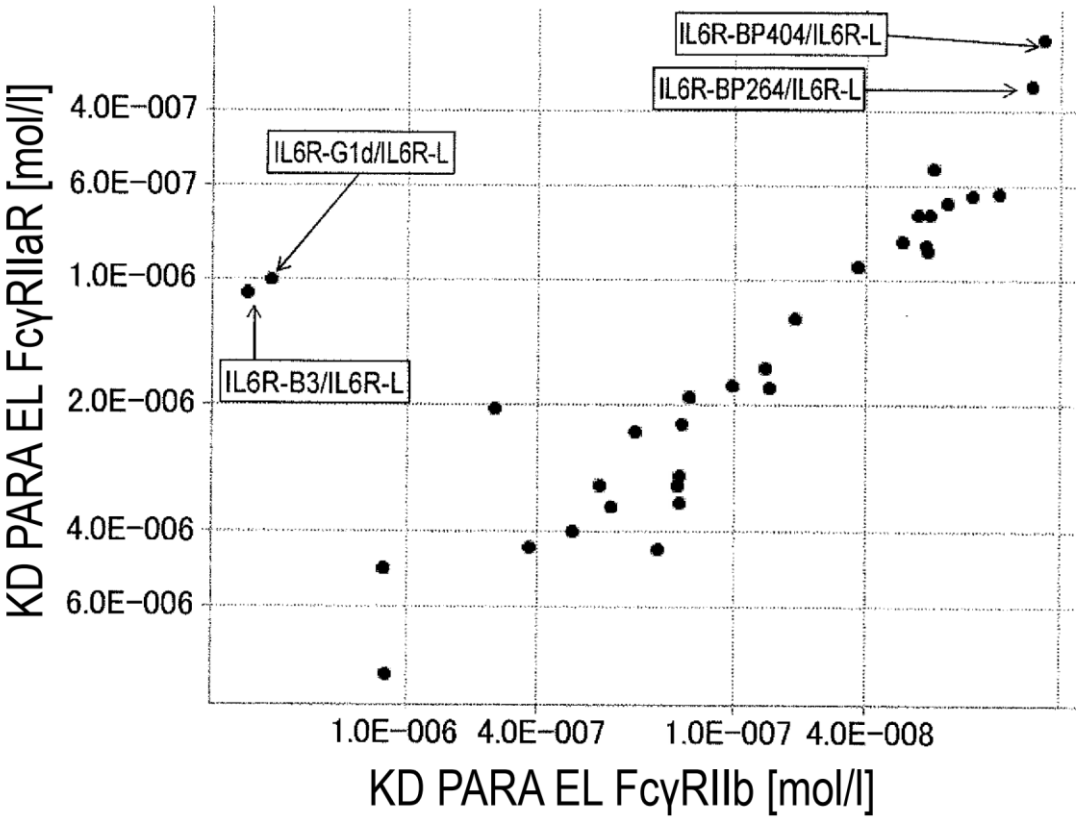

IL6R-BP404/IL6R-L
IL6R-BP264/IL6R-L
IL6R-G1d/IL6R-L
IL6R-B3/IL6R-L
KD PARA EL FcγRIIaR [mol/l]
4.0E−007
6.0E−007
1.0E−006
2.0E−006
4.0E−006
6.0E−006
1.0E−006
4.0E−007
1.0E−007
4.0E−008
KD PARA EL FcγRIIb [mol/l]

FIG. 16

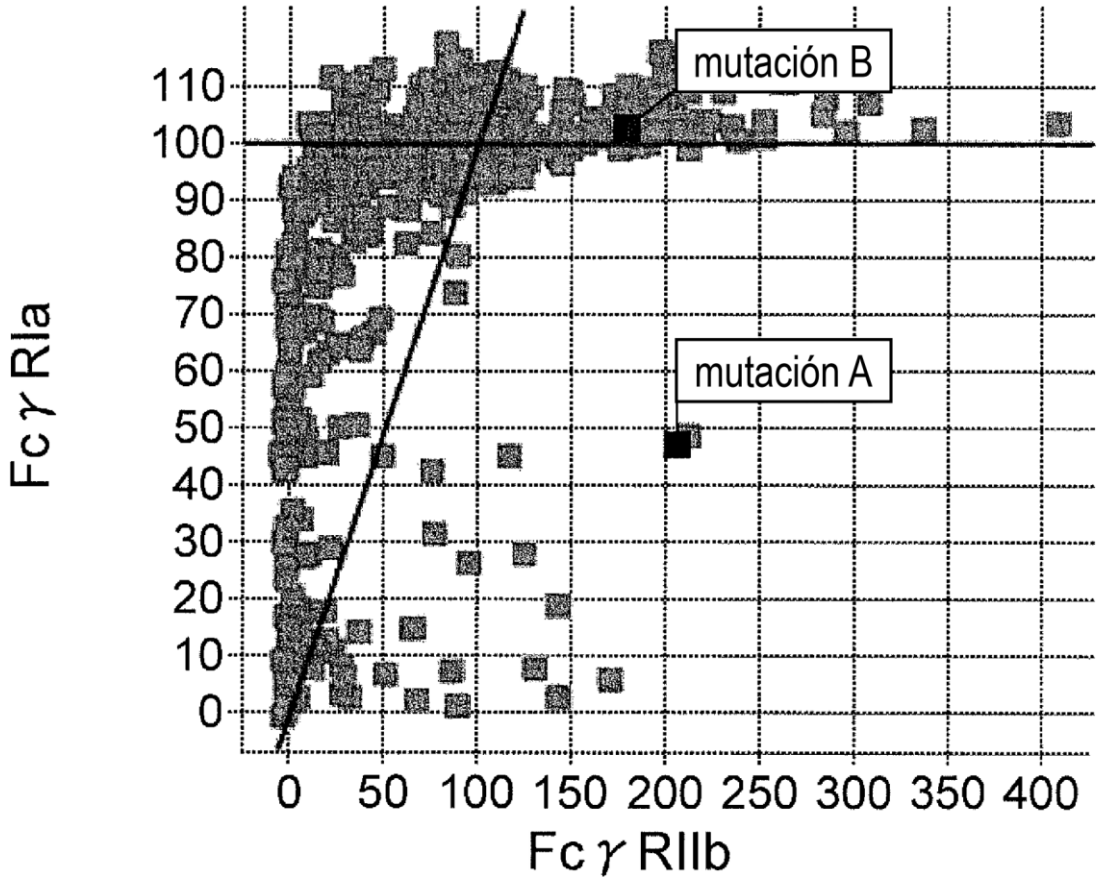

mutación B
mutación A
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 50 100 150 200 250 300 350 400
Fc γ RIIb
Fc γ RIa

FIG. 17

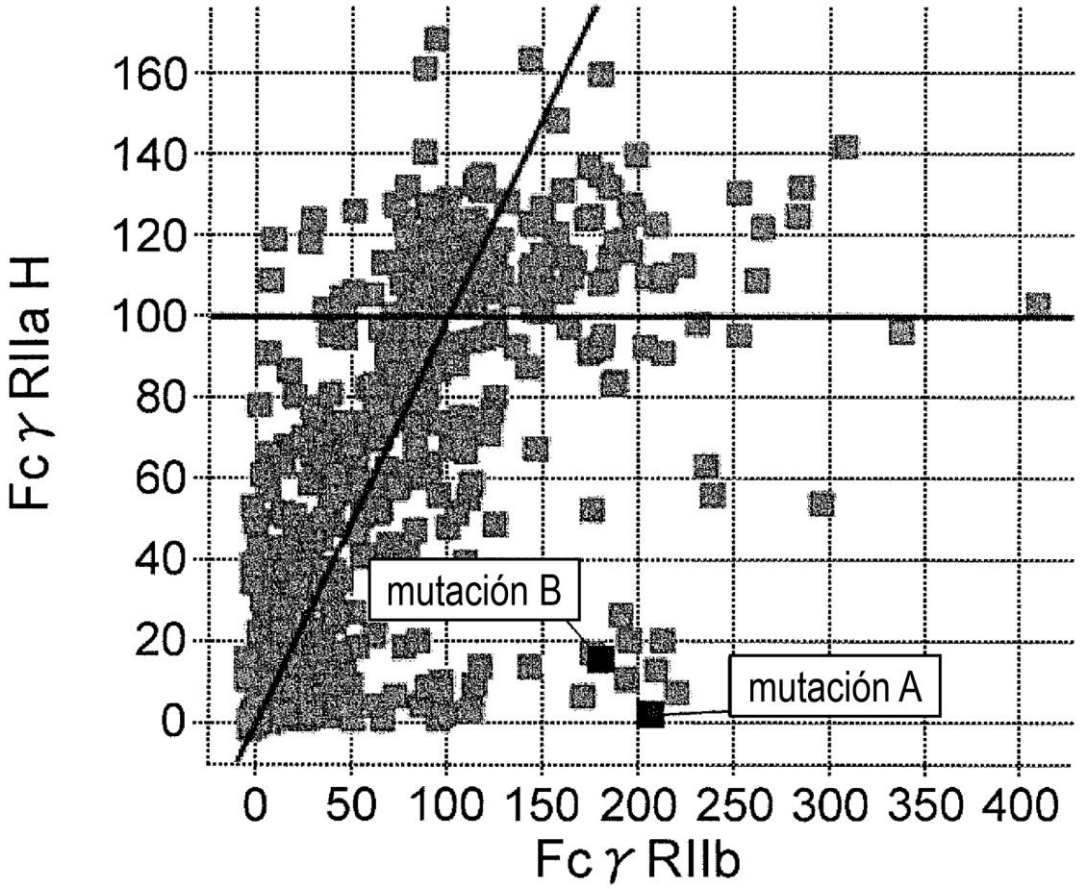

160
140
120
100
80
60
40
20
0
Fc γ RIIa H
mutación B
mutación A
0
50
100
150
200
250
300
350
400
Fc γ RIIb

FIG. 18

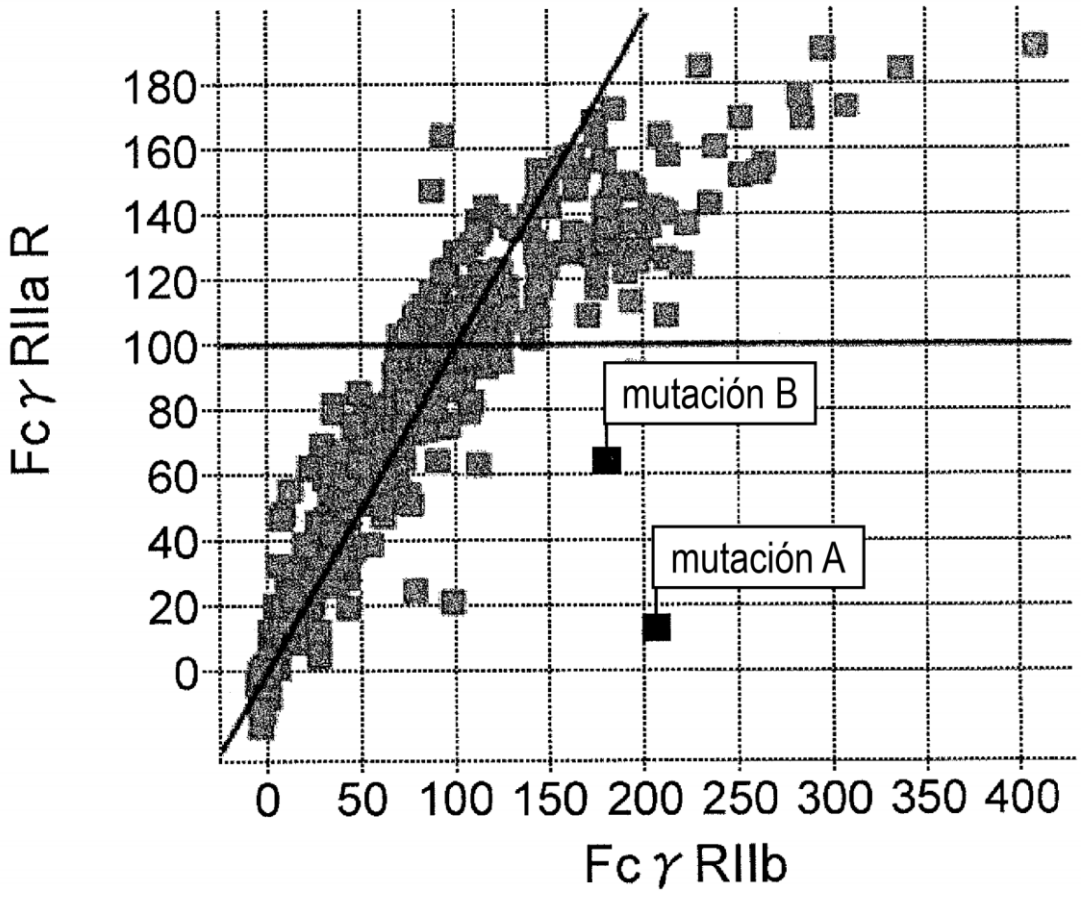

Fc γ RIIa R
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
mutación B
mutación A
0
50
100
150
200
250
300
350
400
Fc γ RIIb

FIG. 19

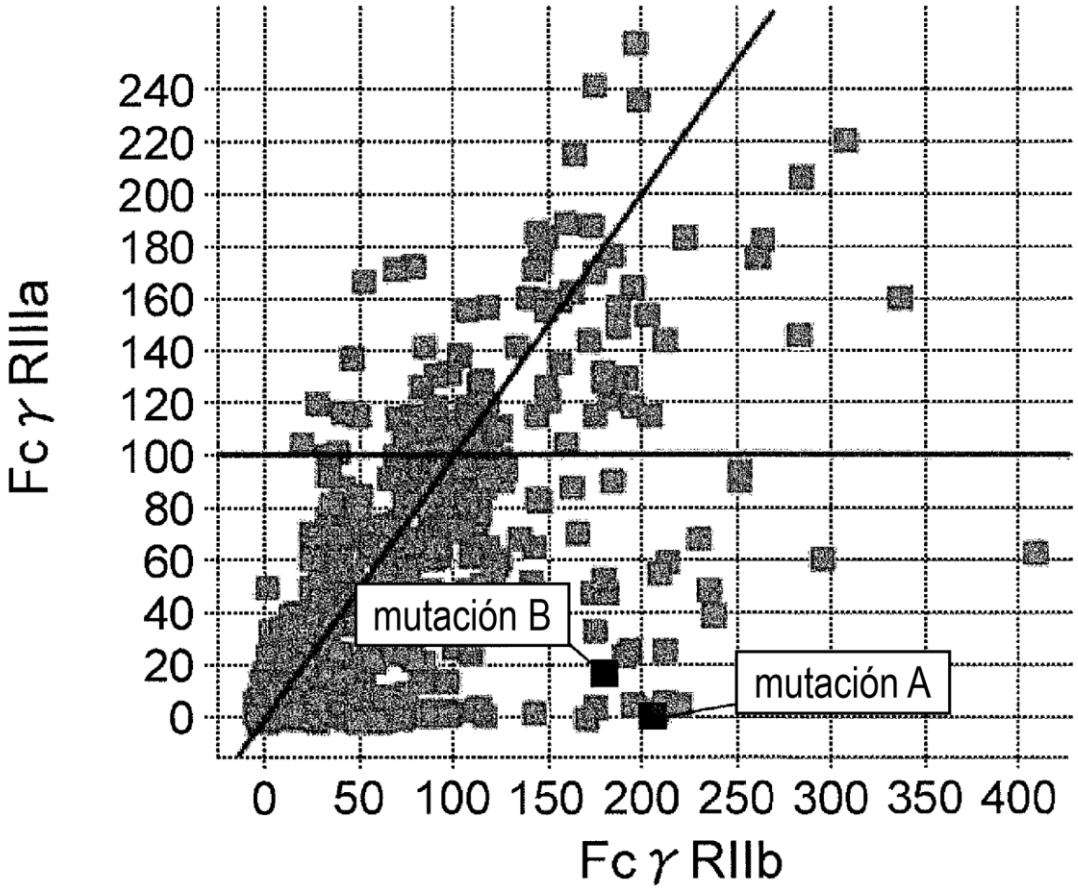

Fc γ RIIIa
240
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
mutación B
mutación A
0
50
100
150
200
250
300
350
400
Fc γ RIIb

FIG. 20

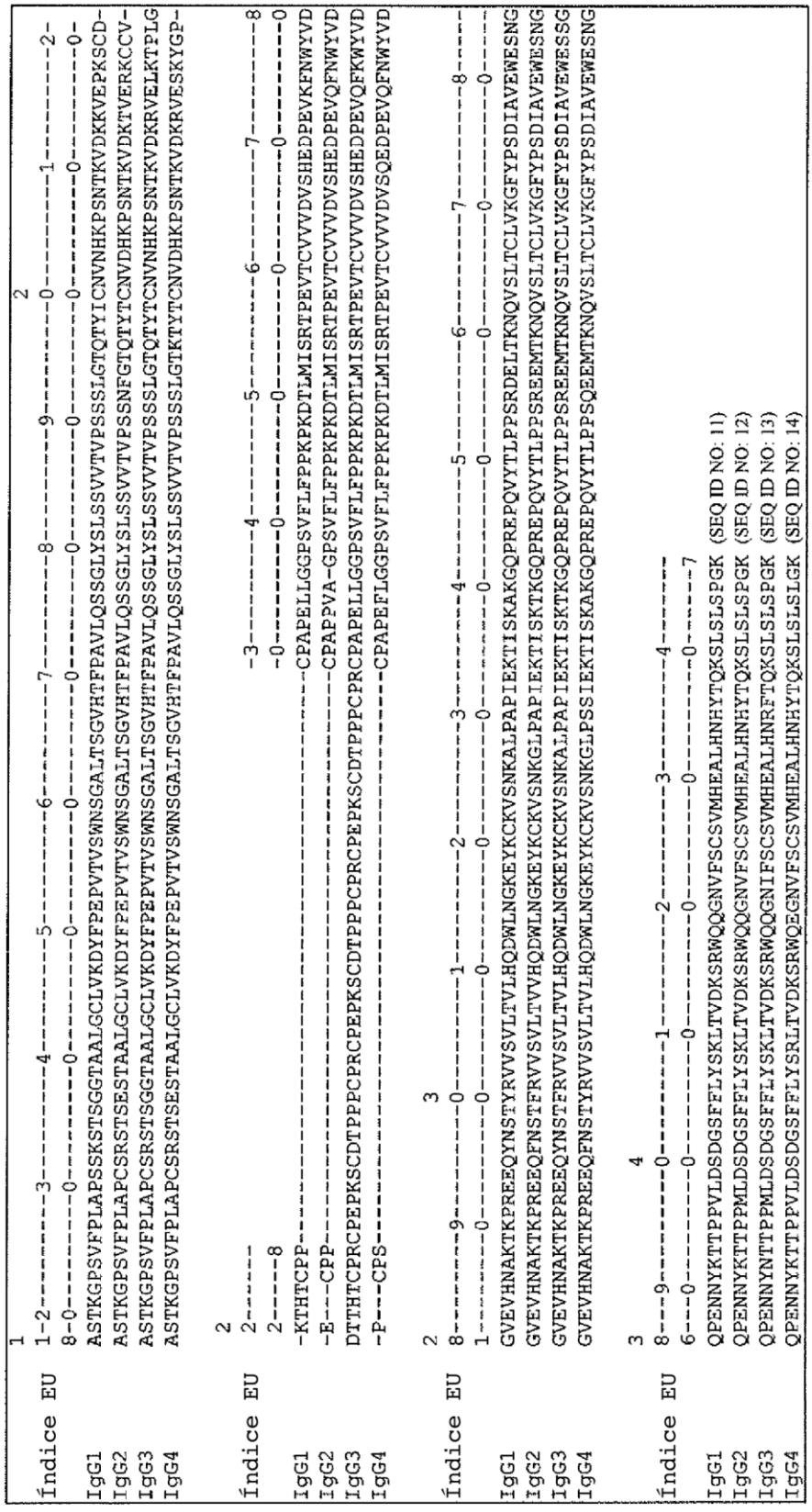

Índice EU
IgG1
IgG2
IgG3
IgG4
(SEQ ID NO: 11)
(SEQ ID NO: 12)
(SEQ ID NO: 13)
(SEQ ID NO: 14)

FIG. 21

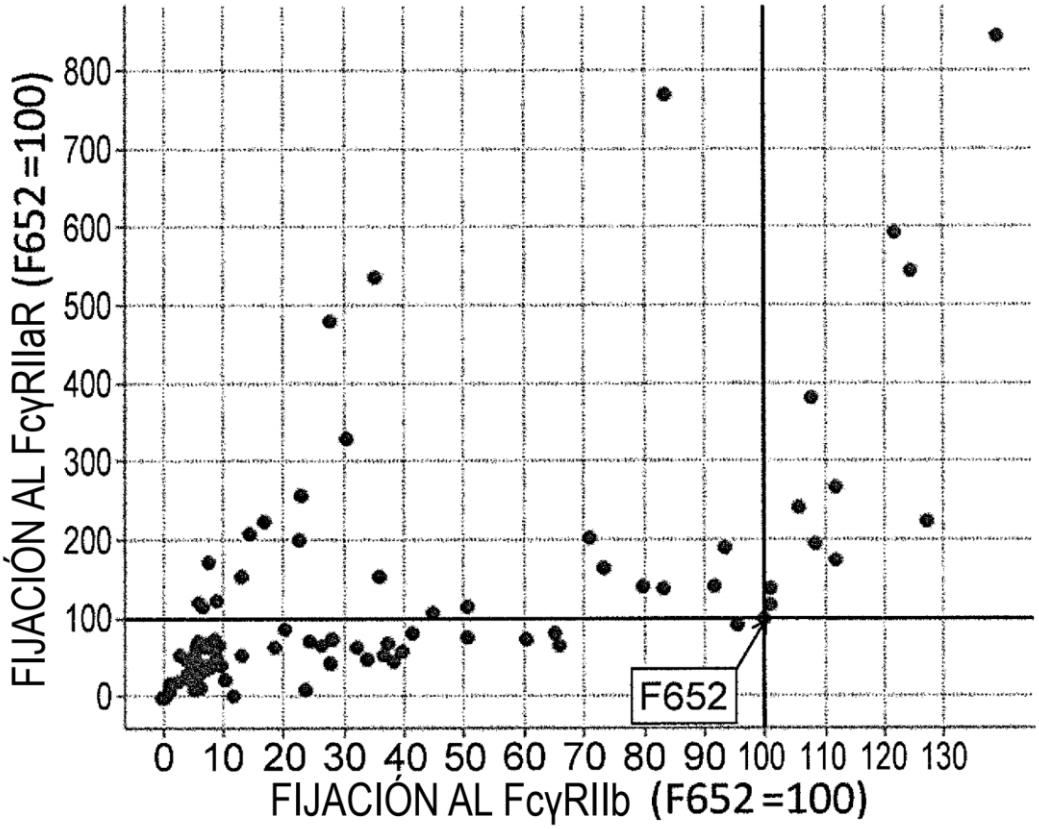

FIJACIÓN AL FcγRIIaR (F652=100)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
F652
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
FIJACIÓN AL FcγRIIb (F652=100)

FIG. 22

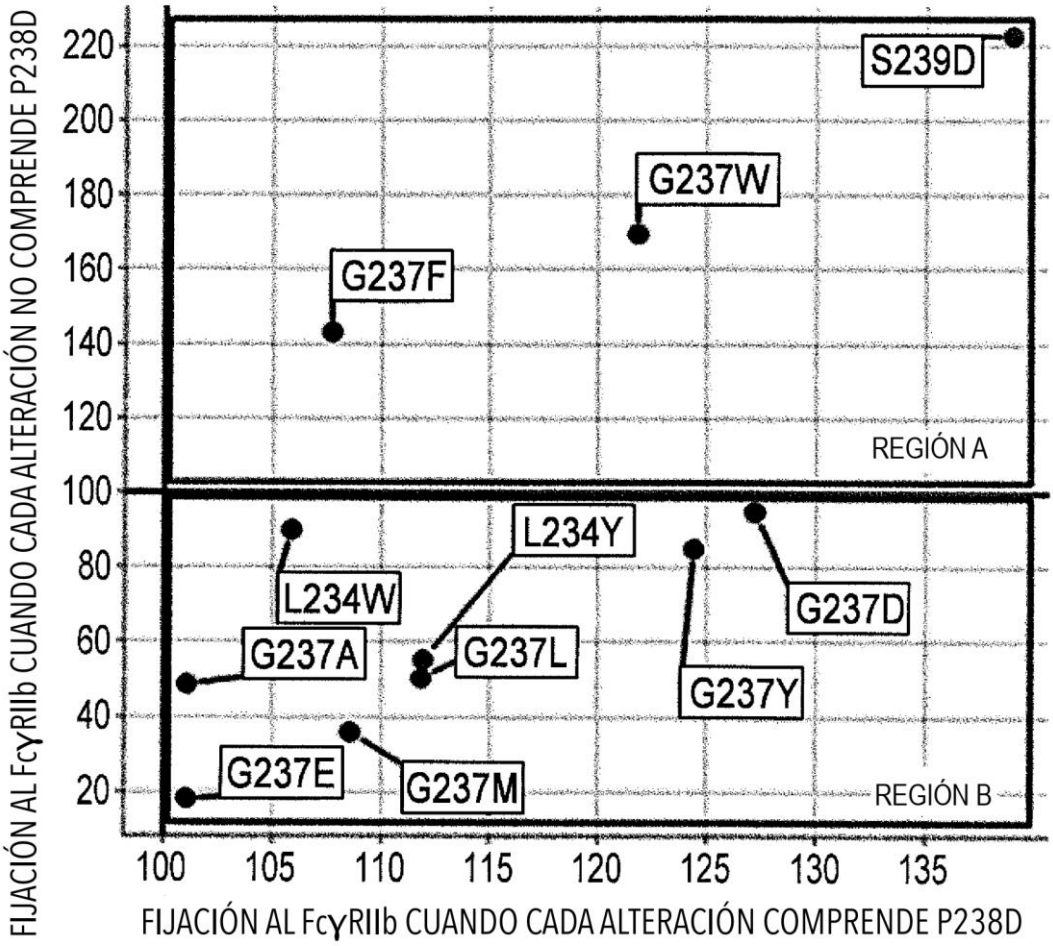

FIJACIÓN AL FcγRIIb CUANDO CADA ALTERACIÓN NO COMPRENDE P238D
220
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
S239D
G237W
G237F
REGIÓN A
L234Y
L234W
G237D
G237A
G237L
G237Y
G237E
G237M
REGIÓN B
100
105
110
115
120
125
130
135
FIJACIÓN AL FcγRIIb CUANDO CADA ALTERACIÓN COMPRENDE P238D

FIG. 23

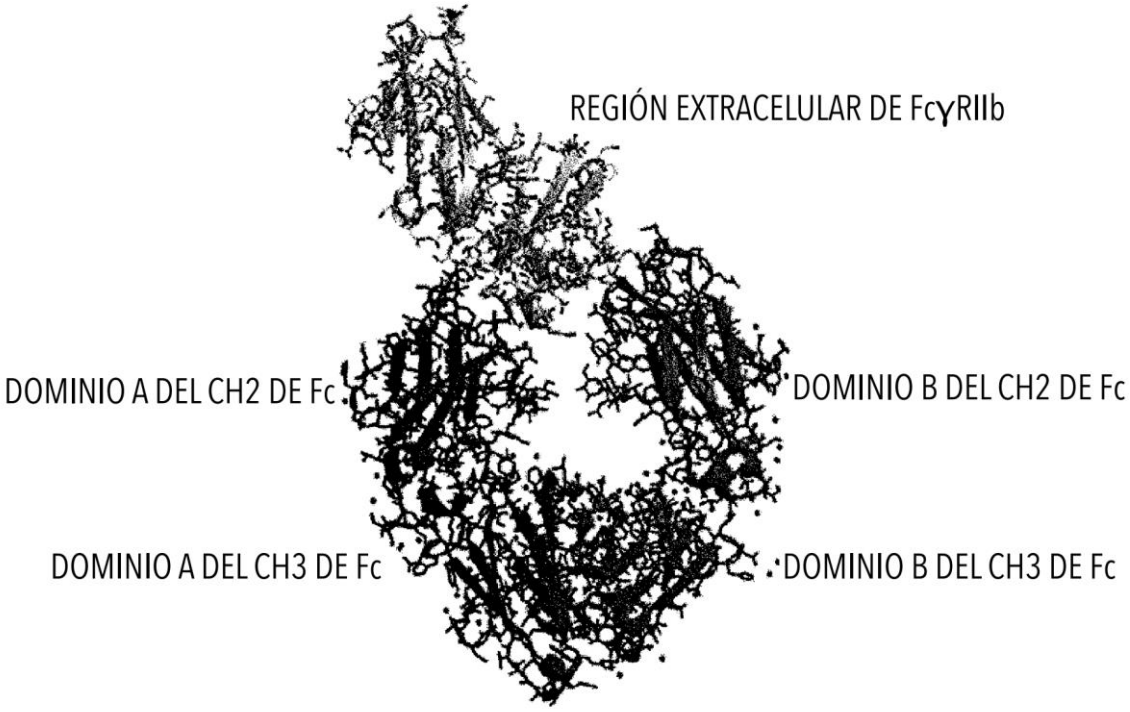
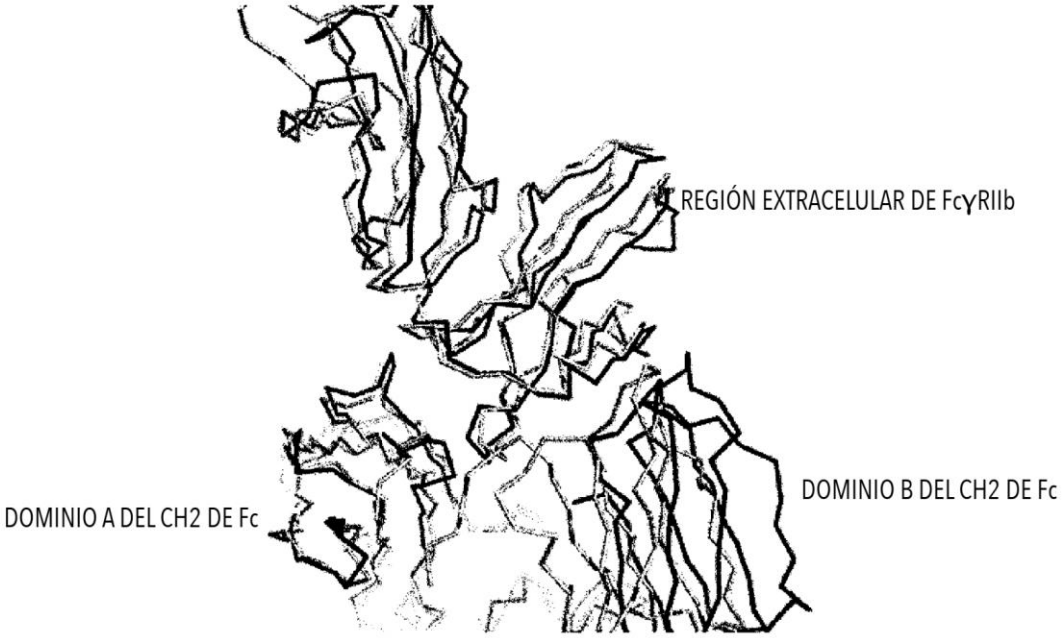
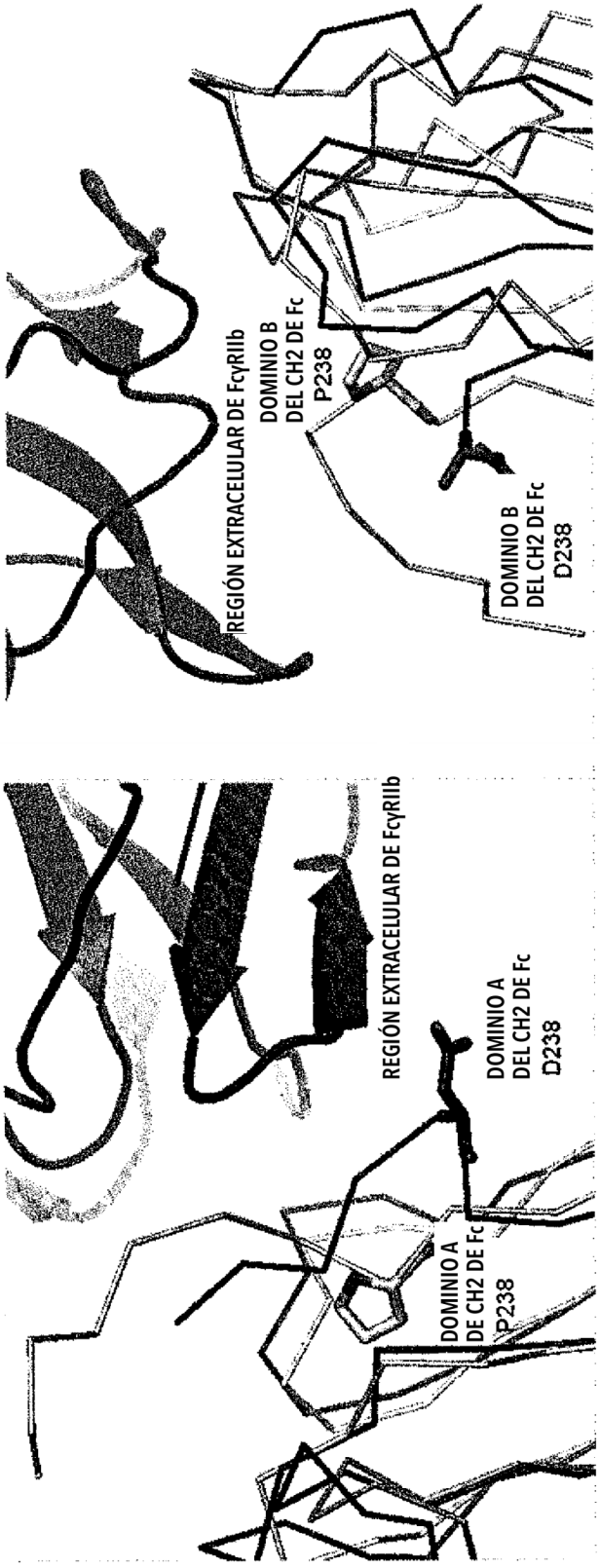

REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIb
DOMINIO A DEL CH2 DE Fc
DOMINIO B DEL CH2 DE Fc
DOMINIO A DEL CH3 DE Fc
DOMINIO B DEL CH3 DE Fc

FIG. 24



NEGRO: ESTRUCTURA DEL CRISTAL DEL COMPLEJO Fc(P238D)/REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIb
GRIS: ESTRUCTURA MODELO DEL COMPLEJO Fc(tipo silvestre)/REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIb

FIG. 25



NEGRO: ESTRUCTURA DEL CRISTAL DEL COMPLEJO Fc(P238D)/REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIb

GRIS: ESTRUCTURA MODELO DEL COMPLEJO Fc(tipo silvestre)/REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIb

FIG. 26

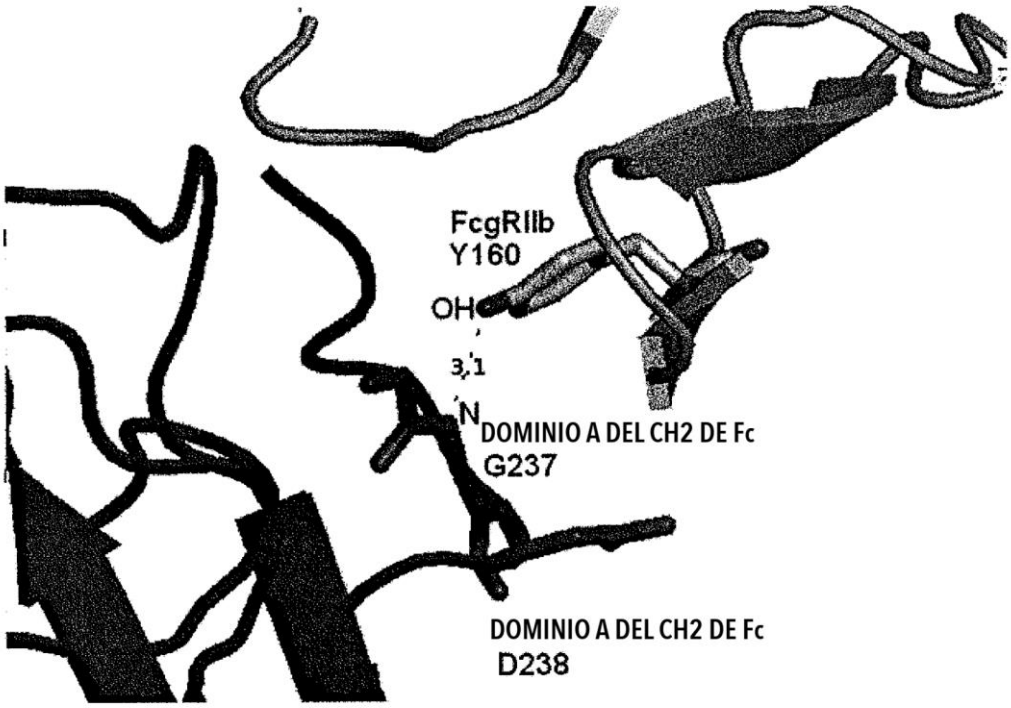

FcgRIIb
Y160
OH
3,1
N
DOMINIO A DEL CH2 DE Fc
G237
DOMINIO A DEL CH2 DE Fc
D238

FIG. 27

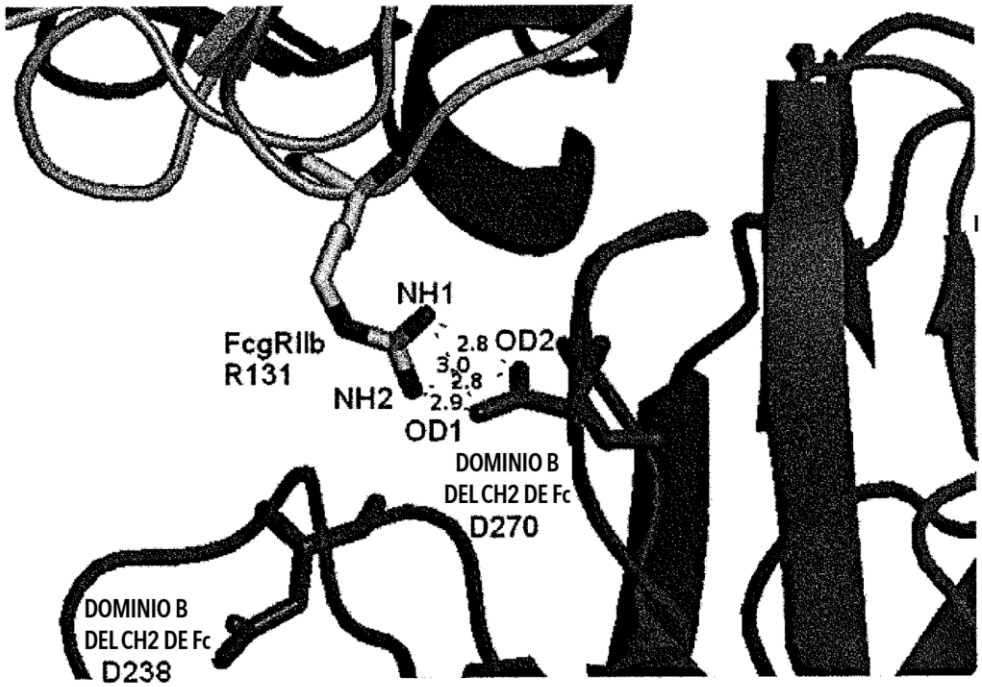

NH1
FcgRIIb
R131
2.8
OD2
3.0
2.8
NH2
2.9
OD1
DOMINIO B
DEL CH2 DE Fc
D270
DOMINIO B
DEL CH2 DE Fc
D238

FIG. 28

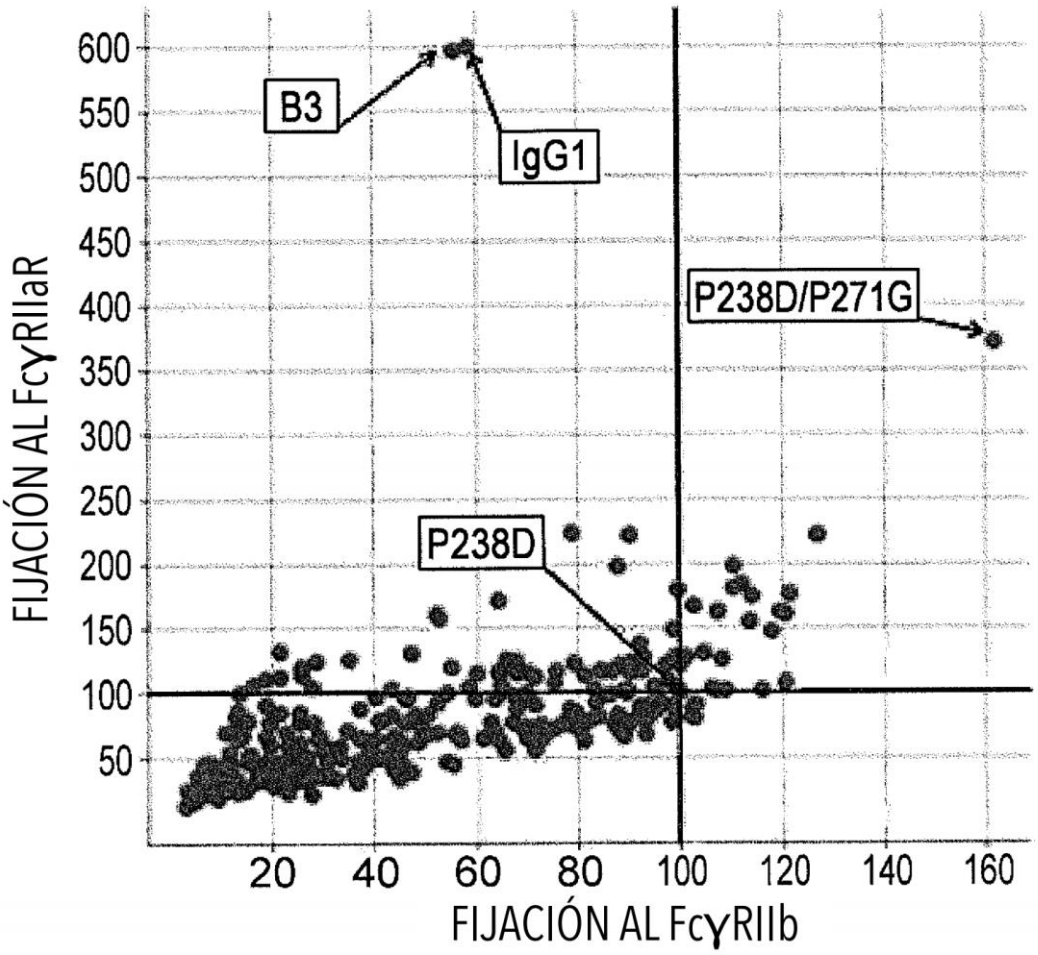

B3
IgG1
P238D/P271G
P238D
FIJACIÓN AL FcγRIIaR
FIJACIÓN AL FcγRIIb
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
20
40
60
80
100
120
140
160

FIG. 29

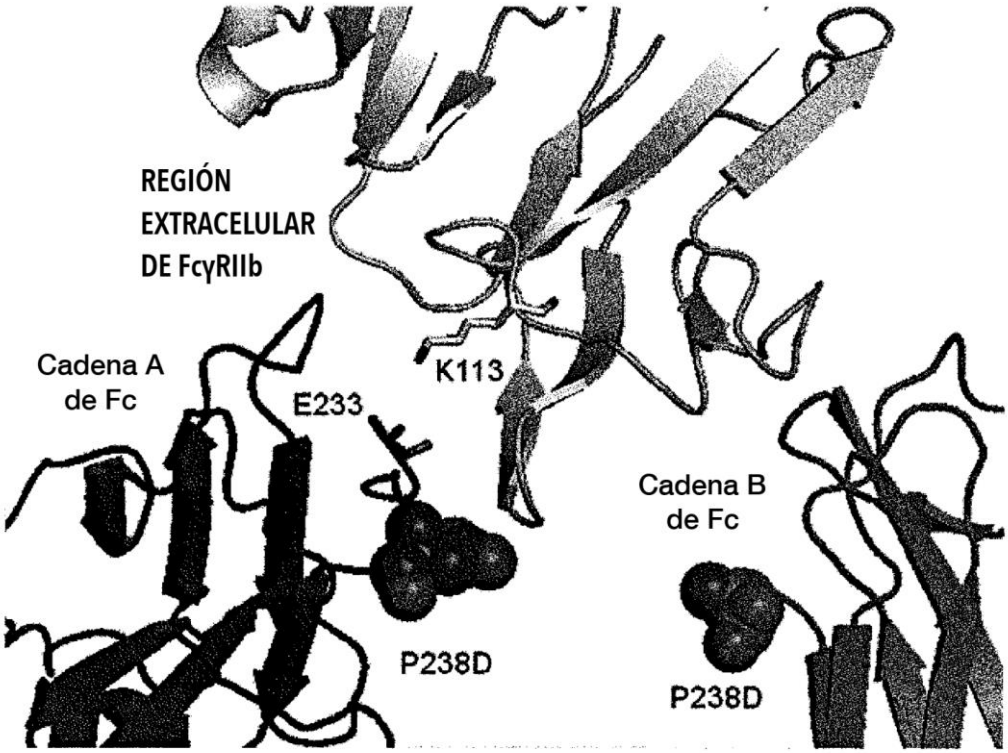

REGIÓN
EXTRACELULAR
DE FcγRIIb
Cadena A
de Fc
E233
K113
Cadena B
de Fc
P238D
P238D

FIG. 30

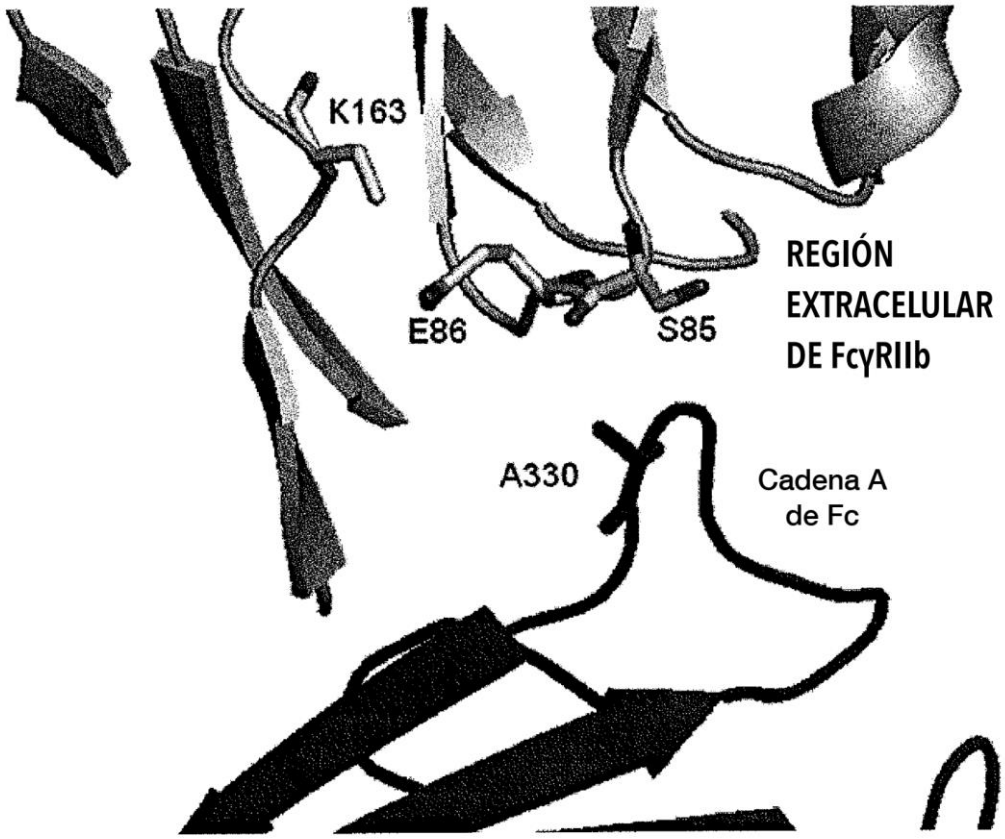
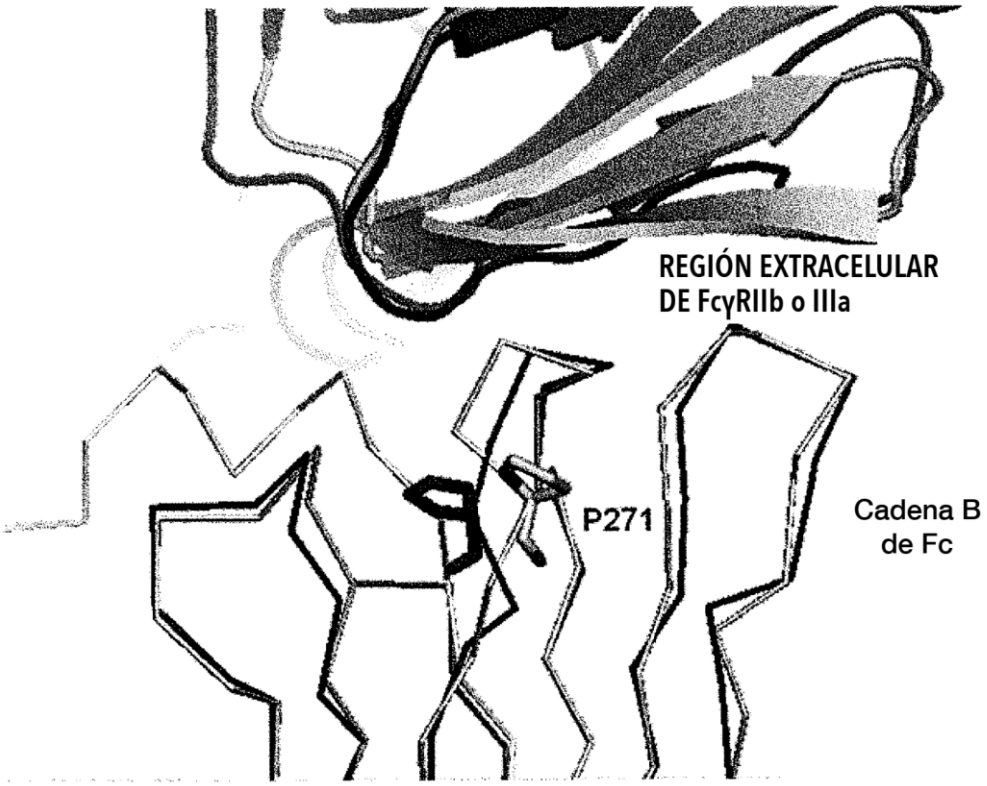

K163
E86
S85
REGIÓN
EXTRACELULAR
DE FcγRIIb
A330
Cadena A
de Fc

FIG. 31



NEGRO: ESTRUCTURA DEL CRISTAL DEL COMPLEJO Fc(P238D)/REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIb
GRIS: ESTRUCTURA DEL CRISTAL DEL COMPLEJO Fc(tipo silvestre)/REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIIa (Código PDB: 3SGJ)

FIG. 32

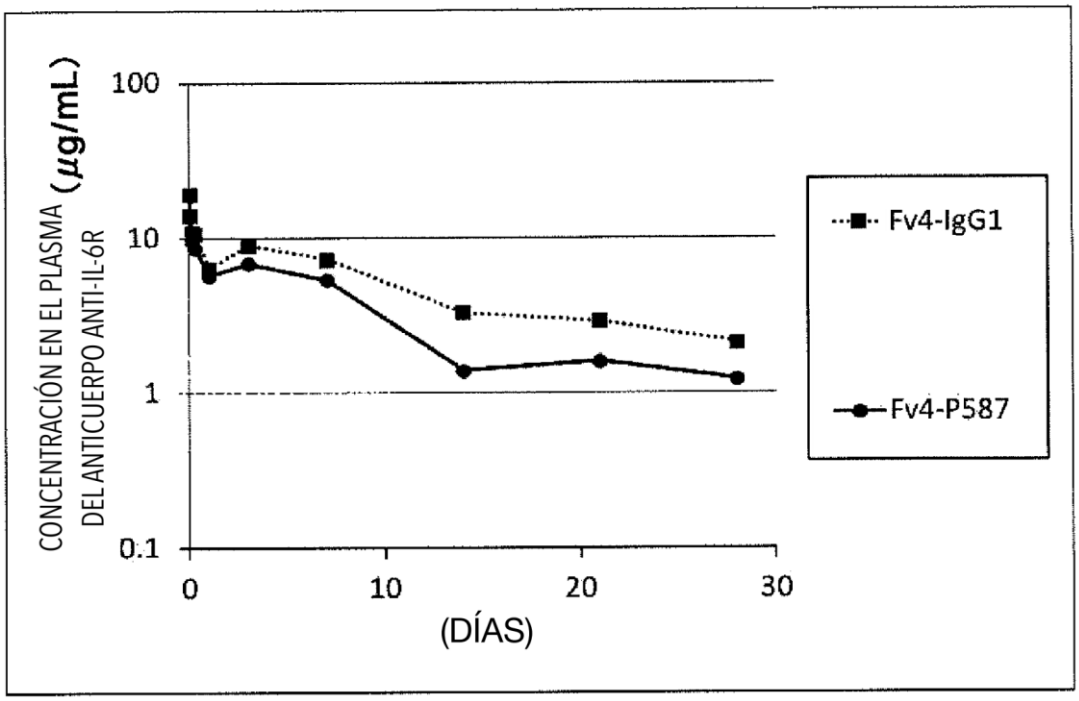

CONCENTRACIÓN EN EL PLASMA (μg/mL)
DEL ANTICUERPO ANTI-IL-6R
100
10
1
0.1
0
10
20
30
(DÍAS)
Fv4-IgG1
Fv4-P587

FIG. 33

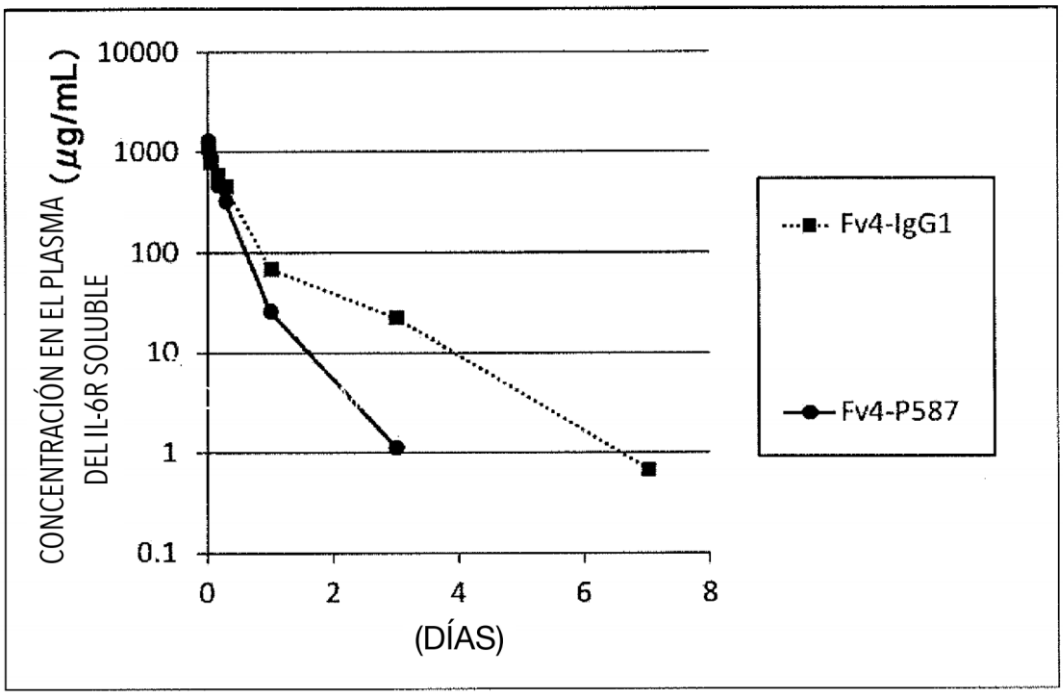

CONCENTRACIÓN EN EL PLASMA (μg/mL)
DEL IL-6R SOLUBLE
10000
1000
100
10
1
0.1
0
2
4
6
8
(DÍAS)
Fv4-IgG1
Fv4-P587

FIG. 34

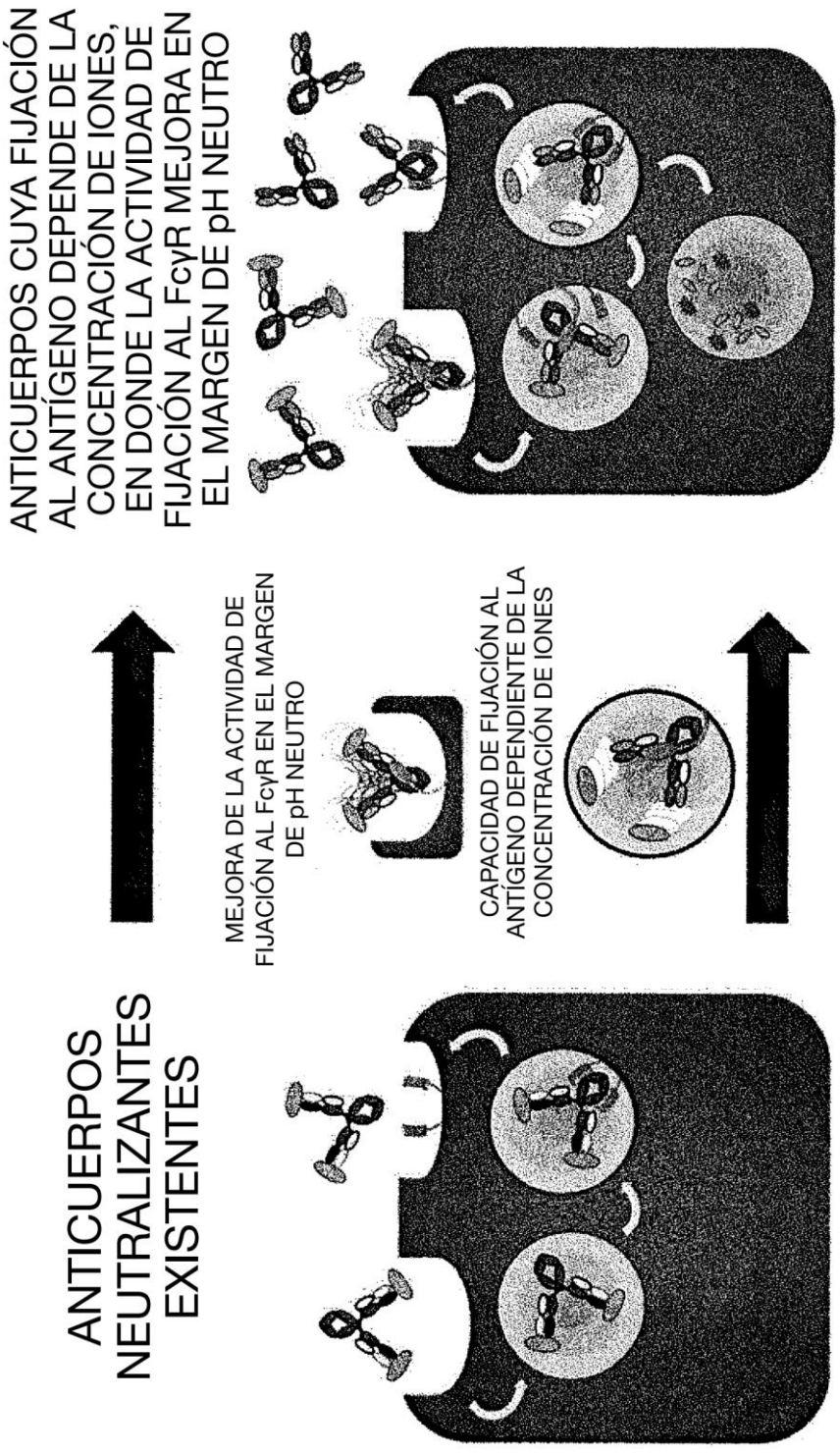

ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES EXISTENTES
MEJORA DE LA ACTIVIDAD DE FIJACIÓN AL FcγR EN EL MARGEN DE pH NEUTRO
CAPACIDAD DE FIJACIÓN AL ANTÍGENO DEPENDIENTE DE LA CONCENTRACIÓN DE IONES
ANTICUERPOS CUYA FIJACIÓN AL ANTÍGENO DEPENDE DE LA CONCENTRACIÓN DE IONES, EN DONDE LA ACTIVIDAD DE FIJACIÓN AL FcγR MEJORA EN EL MARGEN DE pH NEUTRO

FIG. 35

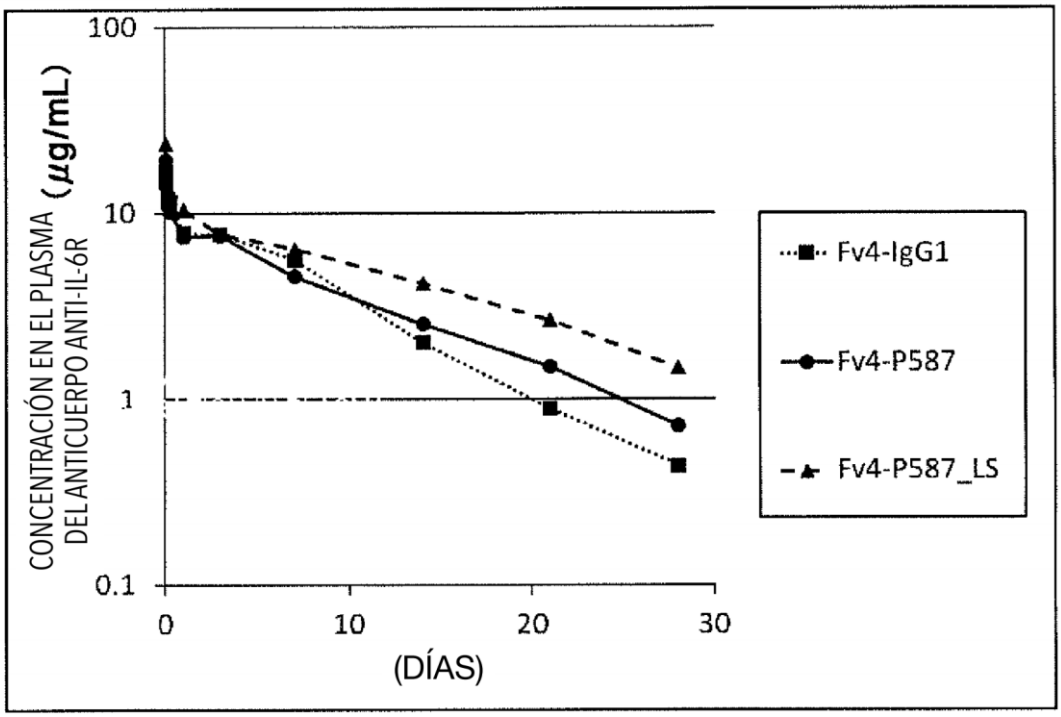

100
10
1
0.1
0
10
20
30
(DÍAS)
CONCENTRACIÓN EN EL PLASMA (µg/mL)
DEL ANTICUERPO ANTI-IL-6R
Fv4-IgG1
Fv4-P587
Fv4-P587_LS

FIG. 36

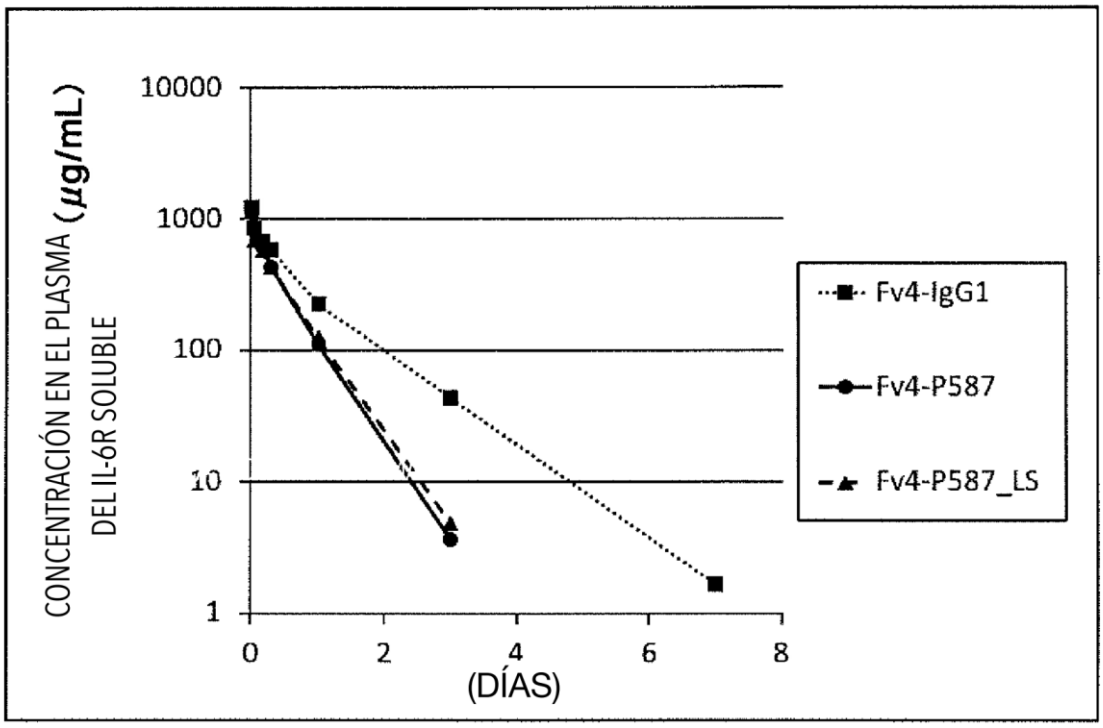

CONCENTRACIÓN EN EL PLASMA (μg/mL)
DEL IL-6R SOLUBLE
10000
1000
100
10
1
0
2
4
6
8
(DÍAS)
Fv4-IgG1
Fv4-P587
Fv4-P587_LS

FIG. 37