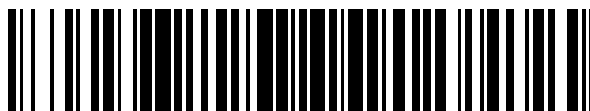


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 901**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 15/00</b>	(2006.01) <b>C07K 16/28</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01) <b>C07K 16/30</b>	(2006.01)
<b>C07K 1/22</b>	(2006.01) <b>C07K 16/36</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/46</b>	(2006.01) <b>C07K 16/00</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/15</b>	(2006.01) <b>C07K 14/735</b>	(2006.01)
<b>C12N 1/19</b>	(2006.01)	
<b>C12N 1/21</b>	(2006.01)	
<b>C12N 5/10</b>	(2006.01)	
<b>C12N 15/09</b>	(2006.01)	
<b>C07K 19/00</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.12.2010 PCT/JP2010/073361**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2011 WO11078332**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2010 E 10839561 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.02.2020 EP 2522724**

54 Título: **Método de modificación de polipéptidos para purificar multímeros polipeptídicos**

30 Prioridad:

**25.12.2009 JP 2009294391**

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

**06.08.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**IGAWA, TOMOYUKI;  
SAMPEI, ZENJIRO;  
WAKABAYASHI, TETSUYA y  
ITO, ERIKO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 777 901 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Método de modificación de polipéptidos para purificar multímeros polipeptídicos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a métodos para producir o purificar multímeros polipeptídicos, multímeros polipeptídicos con una capacidad de unión a proteína A alterada y similares.

10 Técnica anterior

Existen algunos métodos previamente indicados para producir un anticuerpo biespecífico de tipo IgG que tiene una región constante humana (anticuerpo de tipo IgG que tiene una región constante humana y en el que uno de los brazos tiene una actividad de unión específica al antígeno A y el otro tiene una actividad de unión específica al antígeno B).  
 15 En general, un anticuerpo biespecífico de tipo IgG está compuesto por dos tipos de cadenas H (es decir, cadena H contra el antígeno A y cadena H contra el antígeno B) y dos tipos de cadenas L (es decir, cadena L contra el antígeno A y cadena L contra el antígeno B). Cuando se expresa dicho anticuerpo biespecífico de tipo IgG, se expresan dos tipos de cadenas H y dos tipos de cadenas L, y hay diez combinaciones posibles para la combinación H2L2. De estas, solamente una combinación tiene la especificidad de interés (un brazo tiene actividad de unión específica para el antígeno A y el otro tiene actividad de unión específica para el antígeno B). Por lo tanto, para obtener un anticuerpo biespecífico de interés, es necesario purificar un solo anticuerpo de interés de los diez tipos de anticuerpos. Este es un proceso extremadamente ineficaz y difícil.

Existen métodos indicados para resolver este problema que utilizan una cadena L común para que la cadena L contra el antígeno A y la cadena L contra el antígeno B tengan una secuencia de aminoácidos idéntica (Documentos de Patente 1 y 2). Cuando se expresa un anticuerpo biespecífico de tipo IgG que tiene una cadena L común, se expresan dos tipos de cadenas H y un tipo de cadena L común, y existen tres combinaciones posibles para la combinación H2L2. Una de estas combinaciones es un anticuerpo biespecífico de interés. Estas tres combinaciones son: anticuerpo monoespecífico contra el antígeno A (anticuerpo de cadena H homomérico contra el antígeno A), anticuerpo biespecífico contra tanto el antígeno A como el antígeno B (anticuerpo heteromérico con una cadena H contra el antígeno A y una cadena H contra el antígeno B), y un anticuerpo monoespecífico contra el antígeno B (anticuerpo de cadena H homomérico contra el antígeno B). Debido a que su relación es en general 1:2:1, la eficacia de expresión del anticuerpo biespecífico deseado es aproximadamente del 50 %. Se ha indicado un método para mejorar aún más esta eficacia que permite dos tipos de cadenas H asociadas heteroméricamente (Documento de Patente 3). Esto puede aumentar la eficacia de expresión del anticuerpo biespecífico deseado hasta aproximadamente un 90-95 %. Entre tanto, se ha indicado un método para eliminar eficazmente los dos tipos de anticuerpos homoméricos que son impurezas, en el que se introducen sustituciones de aminoácidos en las regiones variables de los dos tipos de cadenas H para darles diferentes puntos isoeléctricos de modo que los dos tipos de anticuerpos homoméricos y el anticuerpo biespecífico de interés (anticuerpo heteromérico) puedan purificarse por cromatografía de intercambio iónico (Documento de Patente 4). Una combinación de los métodos mencionados anteriormente ha permitido producir eficazmente un anticuerpo biespecífico (anticuerpo heteromérico) que tiene una región constante humana de tipo IgG.

Por otro lado, en la producción industrial de anticuerpos de tipo IgG, se debe usar una etapa de purificación por cromatografía con proteína A, pero no se usa necesariamente la cromatografía de intercambio iónico en la etapa de purificación. Por lo tanto, el uso de la cromatografía de intercambio iónico para producir un anticuerpo biespecífico altamente puro conduce a un aumento de los costes de producción. Además, como la cromatografía de intercambio iónico por sí sola puede no garantizar un método de purificación fuerte para productos farmacéuticos, es preferible realizar más de una etapa cromatográfica para eliminar las impurezas.

50 En cualquier caso, es preferible que los anticuerpos biespecíficos también se puedan purificar altamente mediante una etapa cromatográfica que tenga un modo de separación diferente al de la cromatografía de intercambio iónico. Es deseable que, como uno de dichos modos de separación, la cromatografía con proteína A, que debe usarse en la producción industrial de anticuerpos de tipo IgG, pueda purificar anticuerpos biespecíficos a alta pureza.

Un método previamente indicado para purificar un anticuerpo biespecífico (anticuerpo heteromérico) usando proteína A es usar un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de IgG2a de ratón que se une a la proteína A y una cadena H de IgG2b de rata que no se une a la proteína A. Se ha indicado que este método permite que un anticuerpo biespecífico de interés se purifique a una pureza del 95 % mediante la etapa de purificación basada en proteína A sola (Documento no de Patente 1 y Documento de Patente 5). Sin embargo, este método también utiliza la cromatografía de intercambio iónico para mejorar la pureza del anticuerpo biespecífico. En otras palabras, la purificación de un anticuerpo biespecífico altamente puro no se puede lograr mediante la etapa de purificación utilizando solamente cromatografía con proteína A. Además, catumaxomab, un anticuerpo biespecífico producido por el método descrito anteriormente y que tiene una cadena H de IgG2a de ratón y una cadena H de IgG2b de rata, tiene una semivida de aproximadamente 2,1 días en seres humanos, que es extremadamente más corta que la de la IgG1 humana normal (2 a 3 semanas) (Documento no de Patente 2). Además de tener una semivida corta, catumaxomab es altamente inmunogénico debido a sus regiones constantes de ratón y rata (Documento 3 no de Patente). Por lo tanto, un

anticuerpo biespecífico obtenido por tales métodos se considera inapropiado como un producto farmacéutico.

Por otro lado, se ha sugerido que desde el punto de vista de la inmunogenicidad, se puede usar una región constante de IgG3 humana como una región constante de no unión a proteína A (Documento no de Patente 1). Sin embargo, como se sabe que las cadenas H de IgG1 humana e IgG3 humana apenas se asocian entre sí (documento no de Patente 1), es imposible producir un anticuerpo biespecífico de interés usando una cadena H de IgG1 humana y una cadena H de IgG3 humana por el mismo método utilizado para el anticuerpo biespecífico que tiene una cadena H de IgG2a de ratón y una cadena H de IgG2b de rata. Asimismo, se ha indicado que la semivida de la IgG3 humana en seres humanos es generalmente más corta que la de la IgG1 humana, IgG2 humana e IgG4 humana (Documentos no de Patente 4 y 5). En consecuencia, al igual que el anticuerpo biespecífico que usa una IgG2a de ratón y una IgG2b de rata, un anticuerpo biespecífico que usa IgG3 humana también podría tener una semivida corta en seres humanos. Se sugiere que la razón por la cual la asociación de las cadenas H rara vez se produce entre la IgG1 humana y la IgG3 humana es la secuencia bisagra de la IgG3 humana (Documento no de Patente 1). Entre tanto, la razón de la corta semivida de la región constante de IgG3 humana aún no se ha aclarado por completo. Por lo tanto, no se ha indicado hasta ahora con respecto a los anticuerpos biespecíficos que usan una región constante de IgG3 humana como una región constante de no unión a proteína A. Además, tampoco hay un informe sobre los métodos para producir o purificar eficazmente anticuerpos biespecíficos altamente puros que tienen una región constante humana y muestran una semivida similar a la IgG1 humana.

Asimismo, el Documento de Patente 6, p. ej., divulga proteínas heterodiméricas de unión a antígeno biespecíficas, el Documento de Patente 7, p.ej., divulga métodos para preparar anticuerpos biespecíficos heterólogos, el Documento de Patente 8, p. ej., divulga métodos para producir un polipéptido que comprende una mutación en un resto de aminoácido que forma una interfaz polipeptídica de modo que se regule la asociación de polipéptidos, y el Documento no de Patente 6, p. ej., postula que todas las proteínas IgG que se unen a la proteína A tienen His en la posición 435, mientras que las que no, tienen Arg en esa posición.

Documentos de la técnica anterior

#### Documentos de Patente

Documento de Patente 1: WO98050431  
 Documento de Patente 2: WO2006109592  
 Documento de Patente 3: WO2006106905  
 Documento de Patente 4: WO2007114325  
 Documento de Patente 5: WO95033844  
 Documento de Patente 6: WO2010151792  
 Documento de Patente 7: US5945311  
 Documento de Patente 8: EP1870459

#### Documentos no de Patente

Documento no de Patente 1: The Journal of Immunology, 1995, 155:219-225  
 Documento no de Patente 2: J Clin Oncol 26: 2008 (supl 20 de Mayo; abstr 14006)  
 Documento no de Patente 3: Clin Cancer Res 2007 13:3899-3905  
 Documento no de Patente 4: Nat Biotechnol. Dic de 2007; 25(12):1369-72  
 Documento no de Patente 5: J. Clin Invest 1970; 49:673-80  
 Documento no de Patente 6: Scandinavian Journal of Immunology 1982; 15(3):275-78

Divulgación de la invención

[Problemas a Resolver por la Invención]

En general, se puede producir eficazmente un anticuerpo de tipo IgG normal como una IgG altamente pura a través de una etapa de purificación basada en proteína A. Sin embargo, la producción de un anticuerpo biespecífico altamente puro requiere una etapa de purificación adicional usando cromatografía de intercambio iónico. La adición de dicha etapa de purificación por cromatografía de intercambio iónico puede complicar la producción y aumentar el coste de producción. Por lo tanto, es preferible producir un anticuerpo biespecífico altamente puro mediante una etapa de purificación basada en proteína A sola. Un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos que usan solamente una etapa de purificación basada en proteína A para producir o purificar eficazmente un anticuerpo biespecífico de tipo IgG altamente puro que tiene una región constante de cadena pesada de anticuerpo humano.

Entre tanto, como el sitio de unión a proteína A en el dominio Fc es idéntico al sitio de unión a FcRn en el dominio Fc, se espera que sea difícil ajustar la actividad de unión a proteína A mientras se conserva la unión al FcRn humano. La conservación de la capacidad de unión a FcRn humano es muy importante para la retención plasmática larga (semivida larga) en seres humanos, que es característica de los anticuerpos de tipo IgG. La presente invención proporciona métodos que usan solamente una etapa de purificación basada en proteína A para producir o purificar eficazmente un anticuerpo biespecífico altamente puro que mantiene un tiempo de retención en plasma comparable a o más largo que

el de IgG1 humana.

[Medios para Resolver los Problemas]

5 Los presentes inventores descubrieron métodos que usan solamente una etapa de purificación basada en proteína A para purificar o producir eficazmente un multímero polipeptídico altamente puro capaz de unirse a dos o más antígenos, en particular, un anticuerpo multiespecífico de tipo IgG que tiene una región constante humana, alterando su capacidad de unión a proteína A.

10 Asimismo, estos métodos se combinaron con métodos para regular la asociación entre un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno modificando los aminoácidos que constituyen la interfaz formada tras la asociación de los polipéptidos. Mediante esta combinación, la presente invención permite la producción o purificación eficaz de un multímero polipeptídico altamente puro de interés.

15 Los presentes inventores también descubrieron que modificando el resto de aminoácido en la posición 435 (numeración EU) en la región constante de cadena pesada, la capacidad de unión a proteína A podría ajustarse manteniendo su retención en plasma comparable a o más larga que la de IgG1 humana. Basándose en este hallazgo, se puede producir o purificar un anticuerpo biespecífico altamente puro con un tiempo de retención en plasma comparable a o más largo que el de IgG1 humana.

20 La presente invención se basa en los hallazgos descritos anteriormente, y proporciona el tema en cuestión tal como se define en las reivindicaciones.

25 De manera específica, la presente invención proporciona [1] a [5] a continuación:

[1] Un método para producir un multímero polipeptídico que comprende un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, que comprende las etapas de:

30 (a) expresar un ADN que codifica el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un ADN que codifica el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno; y

35 (b) recoger el producto de expresión de la etapa (a) por cromatografía de afinidad con proteína A, en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno comprenden una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo o una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo;

40 en donde el dominio Fc de anticuerpo o la región constante de cadena pesada de anticuerpo deriva de IgG humana; en donde el resto de aminoácido en la posición 435 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos del dominio Fc o de la región constante de cadena pesada es histidina o arginina en el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y arginina o histidina respectivamente en el segundo polipéptido que tiene o no tiene una actividad de unión a antígeno;

45 en donde la combinación de aminoácidos en las posiciones 356 y 439 en la secuencia de aminoácidos de la región Fc o región constante de cadena pesada del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno se ha modificado a aminoácidos con la misma carga eléctrica; y

50 en donde la combinación de aminoácidos en las posiciones 356 y 439 en la secuencia de aminoácidos de la región Fc o región constante de cadena pesada del segundo polipéptido que tiene o no tiene una actividad de unión a antígeno se ha modificado a aminoácidos con una carga eléctrica opuesta a la del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno.

[2] El método de [1],

55 i) en donde la pureza del multímero polipeptídico recogido es del 95 % o más; y/o

60 ii) en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprenden una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de anticuerpo,

particularmente en donde se ha modificado al menos un resto de aminoácido en las secuencias de aminoácidos de FR1, CDR2 y FR3 de la región variable de cadena pesada de anticuerpo; y/o

65 iii) en donde el multímero polipeptídico comprende uno o dos terceros polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno, y la etapa (a) comprende expresar un ADN que codifica el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, particularmente

a) en donde el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de

aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo,  
y/o

5 b) en donde el multímero polipeptídico comprende adicionalmente un cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, y la etapa (a) comprende expresar un ADN que codifica el cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, especialmente

10 b1) en donde al menos uno de los polipéptidos tercero y cuarto que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo,

o  
15 b2) en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena ligera de anticuerpo y de una región constante de cadena pesada de anticuerpo; el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de anticuerpo; el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de anticuerpo y de una región constante de cadena ligera de anticuerpo; y el cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo;

20 y/o

iv) en donde el multímero polipeptídico es un anticuerpo multiespecífico, particularmente en donde el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico.

25 [3] El método de uno cualquiera de [1] y [2] i) a [2] iv), que comprende el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que no tiene actividad de unión a antígeno, y en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio de unión a antígeno de un receptor y una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo, y el segundo polipéptido que no tiene actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo.

[4] Un método para purificar un multímero polipeptídico que comprende un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, que comprende las etapas de:

35 (a) expresar un ADN que codifica el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un ADN que codifica el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno; y

40 (b) recoger el producto de expresión de la etapa (a) por cromatografía de afinidad con proteína A, en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno comprenden una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo o una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo;

45 en donde el dominio Fc de anticuerpo o la región constante de cadena pesada de anticuerpo deriva de IgG humana; en donde el resto de aminoácido en la posición 435 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos del dominio Fc o de la región constante de cadena pesada es histidina o arginina en el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y arginina o histidina respectivamente en el segundo polipéptido que tiene o no tiene una actividad de unión a antígeno;

50 en donde la combinación de aminoácidos en las posiciones 356 y 439 en la secuencia de aminoácidos de la región Fc o región constante de cadena pesada del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno se ha modificado a aminoácidos con la misma carga eléctrica; y

55 en donde la combinación de aminoácidos en las posiciones 356 y 439 en la secuencia de aminoácidos de la región Fc o región constante de cadena pesada del segundo polipéptido que tiene o no tiene una actividad de unión a antígeno se ha modificado a aminoácidos con una carga eléctrica opuesta a la del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno.

[5] El método de [4],

60 i) en donde la pureza del multímero polipeptídico recogido es del 95 % o más;  
y/o

ii) en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprenden una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de anticuerpo,

65 particularmente en donde se ha modificado al menos un resto de aminoácido en las secuencias de aminoácidos de FR1, CDR2 y FR3 de la región variable de cadena pesada de anticuerpo; y/o

iii) en donde el multímero polipeptídico comprende uno o dos terceros polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno, y la etapa (a) comprende expresar un ADN que codifica el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, particularmente

5 a) en donde el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo,  
y/o  
b) en donde el multímero polipeptídico comprende adicionalmente un cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, y la etapa (a) comprende expresar un ADN que codifica el cuarto polipéptido  
10 que tiene una actividad de unión a antígeno,  
especialmente

b1) en donde al menos uno de los polipéptidos tercero y cuarto que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo,  
15 o  
b2) en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena ligera de anticuerpo y de una región constante de cadena pesada de anticuerpo; el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de anticuerpo; el tercer polipéptido  
20 que tiene una actividad de unión a antígeno comprende secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de anticuerpo y de una región constante de cadena ligera de anticuerpo; y el cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo;

25 y/o

iv) en donde el multímero polipeptídico es un anticuerpo multiespecífico, particularmente en donde el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico.

30 En el presente documento se divulgan adicionalmente los siguientes elementos [1] a [55]:

[1] Un método para producir un multímero polipeptídico que comprende un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, que comprende las etapas de:

35 (a) expresar un ADN que codifica el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un ADN que codifica el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno; y  
40 (b) recoger el producto de expresión de la etapa (a),

en donde se han modificado uno o más restos de aminoácidos en uno o ambos del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, de modo que existe una mayor diferencia de capacidad de unión a proteína A entre el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno.  
45

[2] El método de [1], en donde el producto de expresión se recoge usando cromatografía de afinidad con proteína A en la etapa (b).

[3] El método de [1] o [2], en donde se han modificado uno o más restos de aminoácidos en uno o ambos del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, de modo que existe una mayor diferencia entre el pH del disolvente para eluir el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno de la proteína A y aquel para eluir el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno de la proteína A.  
50

[4] El método de uno cualquiera de [1] a [3], en donde se han modificado uno o más restos de aminoácidos en el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o en el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, para aumentar o reducir la capacidad de unión a proteína A de cualquiera de los dos del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno.  
55

[5] El método de uno cualquiera de [1] a [4], en donde se han modificado uno o más restos de aminoácidos en el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y en el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, para aumentar la capacidad de unión a proteína A de cualquiera de los dos del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, y reducir la capacidad de unión a proteína A del otro polipéptido.  
60

[6] El método de uno cualquiera de [1] a [5], en donde la pureza del multímero polipeptídico recogido es del 95 % o más.  
65

[7] El método de uno cualquiera de [1] a [6], en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno comprenden una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo o una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo.

[8] El método de [7], en donde se ha modificado al menos un resto de aminoácido seleccionado de los restos de aminoácidos de las posiciones 250 a 255, 308 a 317 y 430 a 436 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos del dominio Fc de anticuerpo o de la región constante de la cadena pesada de anticuerpo.

[9] El método de uno cualquiera de [1] a [8], en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprenden una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de anticuerpo.

[10] El método de [9], en donde se ha modificado al menos un resto de aminoácido en las secuencias de aminoácidos de FR1, CDR2 y FR3 de la región variable de cadena pesada de anticuerpo.

[11] El método de uno cualquiera de [1] a [10], en donde el multímero polipeptídico comprende uno o dos terceros polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno, y la etapa (a) comprende expresar un ADN que codifica el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno.

[12] El método de [11], en donde el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo.

[13] El método de [11] o [12], en donde el multímero polipeptídico comprende adicionalmente un cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y la etapa (a) comprende expresar un ADN que codifica el cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno.

[14] El método de [13], en donde al menos uno de los polipéptidos tercero y cuarto que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo.

[15] El método de [13], en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena ligera de anticuerpo y de una región constante de cadena pesada de anticuerpo; el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de anticuerpo; el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de anticuerpo y de una región constante de cadena ligera de anticuerpo; y el cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo.

[16] El método de uno cualquiera de [1] a [15], en donde el multímero polipeptídico es un anticuerpo multiespecífico.

[17] El método de [16], en donde el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico.

[18] El método de uno cualquiera de [1] a [8], que comprende el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que no tiene actividad de unión a antígeno, y en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio de unión a antígeno de un receptor y una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo, y el segundo polipéptido que no tiene actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo.

[19] El método de uno cualquiera de [7] a [18], en donde el dominio Fc de anticuerpo o la región constante de cadena pesada de anticuerpo deriva de IgG humana.

[20] Un multímero polipeptídico producido por el método de uno cualquiera de [1] a [19].

[21] Un método para purificar un multímero polipeptídico que comprende un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, que comprende las etapas de:

(a) expresar un ADN que codifica el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un ADN que codifica el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno; y

(b) recoger el producto de expresión de la etapa (a) por cromatografía de afinidad con proteína A,

en donde se han modificado uno o más restos de aminoácidos en uno o ambos del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, de modo que existe una mayor diferencia de capacidad de unión a proteína A entre el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno.

[22] El método de [21], en donde se han modificado uno o más restos de aminoácidos en el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o en el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, para aumentar o reducir la capacidad de unión a proteína A del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno.

[23] El método de [20] o [21], en donde se han modificado uno o más restos de aminoácidos en el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y en el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, para aumentar la capacidad de unión a proteína A de cualquiera de los dos del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno y reducir la capacidad de unión a proteína A del otro polipéptido.

[24] El método de uno cualquiera de [21] a [23], en donde la pureza del multímero polipeptídico recogido es del

95 % o más.

[25] El método de uno cualquiera de [21] a [24], en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno comprenden una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo o una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo.

[26] El método de [25], en donde se ha modificado al menos un resto de aminoácido seleccionado de los restos de aminoácidos de las posiciones 250 a 255, 308 a 317 y 430 a 436 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos del dominio Fc de anticuerpo o de la región constante de la cadena pesada de anticuerpo.

[27] El método de uno cualquiera de [21] a [26], en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprenden una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de anticuerpo.

[28] El método de [27], en donde se ha modificado al menos un resto de aminoácido en las secuencias de aminoácidos de FR1, CDR2 y FR3 de la región variable de cadena pesada de anticuerpo.

[29] El método de uno cualquiera de [21] a [28], en donde el múltiplo polipeptídico comprende uno o dos terceros polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno, y la etapa (a) comprende expresar un ADN que codifica el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno.

[30] El método de [29], en donde el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo.

[31] El método de [29] o [30], en donde el múltiplo polipeptídico comprende adicionalmente un cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y la etapa (a) comprende expresar un ADN que codifica el cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno.

[32] El método de [31], en donde al menos uno de los polipéptidos tercero y cuarto que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo.

[33] El método de [31], en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena ligera de anticuerpo y de una región constante de cadena pesada de anticuerpo; el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de anticuerpo; el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de anticuerpo y de una región constante de cadena ligera de anticuerpo; y el cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo.

[34] El método de uno cualquiera de [21] a [33], en donde el múltiplo polipeptídico es un anticuerpo multiespecífico.

[35] El método de [34], en donde el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico.

[36] El método de uno cualquiera de [25] a [35], en donde el dominio Fc de anticuerpo o la región constante de cadena pesada de anticuerpo deriva de IgG humana.

[37] Un múltiplo polipeptídico que comprende un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, en donde la capacidad de unión a la proteína A es diferente para el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y para el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno.

[38] El múltiplo polipeptídico de [37], en donde existe una diferencia entre el pH del disolvente para eluir el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno de la proteína A y aquel para eluir el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno de la proteína A.

[39] El múltiplo polipeptídico de [37] o [38], en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo o una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo, y en donde al menos se ha modificado un resto de aminoácido seleccionado de los restos de aminoácidos de las posiciones 250 a 255, 308 a 317 y 430 a 436 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos del dominio Fc de anticuerpo o de la región constante de cadena pesada de anticuerpo.

[40] El múltiplo polipeptídico de uno cualquiera de [37] a [39], en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno comprenden una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo o una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo;

en donde el resto de aminoácido de la posición 435 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos del dominio Fc de anticuerpo o de la región constante de cadena pesada de anticuerpo es histidina o arginina en cualquiera de los dos del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno; y

en donde el resto de aminoácido de la posición 435 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos del dominio Fc de anticuerpo o de la región constante de cadena pesada de anticuerpo en cualquiera de dichos polipéptidos es diferente de aquel en el otro polipéptido.

[41] El múltiplo polipeptídico de uno cualquiera de [37] a [40], en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno comprenden una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo o una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo;

en donde el resto de aminoácido de la posición 435 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos del dominio



Fc de anticuerpo o de la región constante de cadena pesada de anticuerpo es histidina en cualquiera de los dos del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno; y

en donde el resto de aminoácido de la posición 435 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos del dominio Fc de anticuerpo o de la región constante de cadena pesada de anticuerpo es arginina en el otro polipéptido.

[42] El multímero polipeptídico de uno cualquiera de [37] a [41], en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprenden una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de anticuerpo y se ha modificado al menos un resto de aminoácido en las secuencias de aminoácidos de FR1, CDR2 y FR3 de la región variable de cadena pesada.

[43] El multímero polipeptídico de uno cualquiera de [37] a [42], que además comprende uno o dos terceros polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno.

[44] El multímero polipeptídico de [43], en donde el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo.

[45] El multímero polipeptídico de [43] o [44], que además comprende uno cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno.

[46] El multímero polipeptídico de [45], en donde al menos uno de los polipéptidos tercero y cuarto que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo.

[47] El multímero polipeptídico de [45], en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena ligera de anticuerpo y de una región constante de cadena pesada de anticuerpo; el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de anticuerpo; el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de anticuerpo y de una región constante de cadena ligera de anticuerpo; y el cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo.

[48] El multímero polipeptídico de uno cualquiera de [37] a [47], que es un anticuerpo multiespecífico.

[49] El multímero polipeptídico de [48], en donde el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico.

[50] El multímero polipeptídico de uno cualquiera de [37] a [41], que comprende el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que no tiene actividad de unión a antígeno, y en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio de unión a antígeno de un receptor y una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo, y el segundo polipéptido que no tiene actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo.

[51] El multímero polipeptídico de uno cualquiera de [39] a [50], en donde el dominio Fc de anticuerpo o la región constante de cadena pesada de anticuerpo deriva de IgG humana.

[52] Un ácido nucleico que codifica un polipéptido que constituye el multímero polipeptídico de uno cualquiera de [20] y [37] a [51].

[53] Un vector insertado con el ácido nucleico de [52].

[54] Una célula que comprende el ácido nucleico de [52] o el vector de [53].

[55] Una composición farmacéutica que comprende el multímero polipeptídico de uno cualquiera de [20] y [37] a [51] como principio activo.

#### [Efectos de la invención]

La presente invención proporciona métodos que usan solamente una etapa de purificación basada en proteína A para purificar o producir eficazmente un multímero polipeptídico altamente puro que tiene actividad de unión contra dos o más antígenos (anticuerpo multiespecífico), alterando su capacidad de unión a proteína A. Los métodos de la presente invención permiten la purificación o producción eficaz de un multímero polipeptídico altamente puro de interés sin afectar los efectos de otras modificaciones de aminoácidos de interés. En particular, al combinar estos métodos con un método para regular la asociación entre dos dominios proteicos, los multímeros polipeptídicos de interés pueden producirse o purificarse de manera más eficaz a una mayor pureza.

Los métodos de la presente invención para producir o purificar anticuerpos multiespecíficos se caracterizan porque los restos de aminoácidos en su región constante de cadena pesada de anticuerpo y/o región variable de cadena pesada de anticuerpo se modifican como se define en las reivindicaciones. Las modificaciones de aminoácidos en contexto con la presente invención se introducen en estas regiones para modificar su capacidad de unión a la proteína A. Además, también se pueden obtener otros efectos de la modificación de aminoácidos de interés, por ejemplo, un tiempo de retención en plasma comparable o mayor que el de IgG1 humana. Los métodos de la presente invención permiten la preparación eficaz de anticuerpos multiespecíficos altamente puros que tienen tales efectos por modificación de aminoácidos.

En general, la producción de anticuerpos multiespecíficos de tipo IgG altamente puros requiere una etapa de purificación usando cromatografía de intercambio iónico. Sin embargo, la adición de esta etapa de purificación complica la producción y aumenta el coste de producción. Por otro lado, la purificación que usa solo cromatografía de intercambio iónico puede no ser lo suficientemente fuerte como método de purificación para productos farmacéuticos. Por lo tanto, es una tarea desarrollar un método para producir un anticuerpo biespecífico de tipo IgG usando solamente

una etapa de purificación basada en proteína A, o desarrollar un método de producción fuerte usando una etapa de purificación basada en proteína A y una etapa de cromatografía de intercambio iónico.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 es un gráfico que muestra una evaluación del tiempo de retención en plasma de MRA-IgG1 y MRA-z106/z107k en ratones transgénicos con FcRn humano.  
 La figura 2 es un diagrama que muestra que la misma región en el dominio Fc de anticuerpo se une a la proteína A y a FcRn.
- 10 La figura 3 muestra un curso temporal de las concentraciones en plasma de Q499-z1 18/J339-z1 19/I377-k y Q499-z121/J339-z119/I377-k después de la administración a ratones transgénicos con FcRn humano.  
 La figura 4 es un diagrama esquemático de una molécula GC33-IgG1-CD3-scFv que se une de forma divalente al antígeno específico de cáncer glipicano-3(GPC3) y se une de forma monovalente al antígeno CD3 de linfocitos T.  
 La figura 5 muestra el resultado del análisis de cromatografía de exclusión por tamaño de NTA1L/NTAIR/GC33-k0 y NTA2L/NTA2R/GC33-k0 purificados con proteína A.
- 15 La figura 6 es un diagrama esquemático de una molécula de anticuerpo IgG anti-GPC3 que se une de forma monovalente a glipicano-3.  
 La figura 7 muestra el resultado del análisis de cromatografía de exclusión por tamaño de NTA4L-cont/NTA4R-cont/GC33-k0, NTA4L-G3/NTA4R-cont/GC33-k0 y NTA4L/NTA4R/GC33-k0 purificados con proteína A.
- 20 La figura 8 muestra cromatogramas de NTA4L-cont/NTA4R-cont/GC33-k0, NTA4L-G3/NTA4R-cont/GC33-k0 y NTA4L/NTA4R/GC33-k0 sometidos a purificación por cromatografía en columna con proteína A con elución de gradiente de pH.  
 La figura 9 es un diagrama esquemático de una molécula de proteína de fusión receptor Fc alfa-Fc que se une de forma monovalente a IgA.
- 25 La figura 10 muestra el resultado del análisis de cromatografía de exclusión por tamaño de IAL-cont/IAR-cont e IAL/IAR purificados con proteína A.  
 La figura 11 es un diagrama esquemático de no1, un anticuerpo biespecífico anti-receptor de IL-6/anti-GPC3 de origen natural.  
 La figura 12 es un diagrama esquemático de no2, que se obtuvo intercambiando el dominio VH y el dominio VL del anticuerpo anti-GPC3 en no1.
- 30 La figura 13 es un diagrama esquemático de no3, que se obtuvo modificando no2 para alterar el punto isoeléctrico de cada cadena.  
 La figura 14 es un diagrama esquemático de no5, que se obtuvo modificando no3 para potenciar la asociación heteromérica de las cadenas H y para purificar el anticuerpo asociado de forma heteromérica utilizando la proteína A.
- 35 La figura 15 es un diagrama esquemático de no6, que se obtuvo modificando no5 para potenciar la asociación entre la cadena H de interés y la cadena L de interés.  
 La figura 16 es cromatogramas de anticuerpos biespecíficos anti-receptor de IL-6/anti-GPC3 no1, no2, no3, no5 y no6 en cromatografía de intercambio catiónico para evaluar sus patrones de expresión.
- 40 La figura 17 es un cromatograma de no6 CM eluido con un gradiente de pH de una columna HiTrap protein A HP (GE Healthcare).  
 La figura 18 es un cromatograma de análisis de cromatografía de intercambio catiónico para evaluar una fracción máxima principal obtenida por purificación de una fracción purificada de proteína A de no6 usando una columna SP Sepharose HP (GE Healthcare).

Modo de llevar a cabo la invención

La presente invención proporciona métodos para producir un multímero polipeptídico que comprende un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno como se define en las reivindicaciones. Los métodos de la presente invención para producir un multímero polipeptídico comprenden las etapas de:

- (a) expresar un ADN que codifica un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un ADN que codifica un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno; y  
 (b) recoger los productos de expresión de la etapa (a) por cromatografía de afinidad con proteína A, como se define adicionalmente en las reivindicaciones.

Los métodos de la presente invención para producir un multímero polipeptídico también pueden expresarse como métodos para producir un multímero polipeptídico con una capacidad de unión a proteína A alterada.

En la presente invención, "un polipéptido que tiene una primera actividad de unión a antígeno" puede denominarse "un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno". "Un polipéptido que tiene una segunda actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno" puede denominarse "un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno". Lo mismo se aplica a "un polipéptido que tiene una tercera actividad de unión a antígeno" y a "un polipéptido que tiene una cuarta actividad de

unión a antígeno" descritos a continuación.

En la presente invención, el término "comprende" significa tanto "comprende" como "consiste en".

5 La presente invención también proporciona métodos para purificar un multímero polipeptídico que comprende un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno como se define en las reivindicaciones. Los métodos de la presente invención para purificar un multímero polipeptídico comprenden las etapas de:

- 10 (a) expresar un ADN que codifica un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un ADN que codifica un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno; y  
 (b) recoger los productos de expresión de la etapa (a) por cromatografía de afinidad con proteína A, como se define adicionalmente en las reivindicaciones.

15 Se puede obtener un polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno en el que se han modificado uno o más restos de aminoácidos: preparando un ADN que codifica un polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno,

- 20 modificando uno o más nucleótidos en el ADN;  
 introduciendo el ADN resultante en células conocidas por los expertos en la materia;  
 cultivando las células para expresar el ADN; y  
 recogiendo el producto de expresión.

25 Por lo tanto, los métodos de la presente divulgación para producir un multímero polipeptídico también pueden expresarse como métodos correspondientes que comprenden las etapas de:

- 30 (a) proporcionar un ADN que codifica un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un ADN que codifica un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno;  
 (b) alterar uno o más nucleótidos en uno o ambos ADN de la etapa (a) que codifican los polipéptidos primero y segundo de modo que exista una mayor diferencia de capacidad de unión a proteína A entre el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno;  
 35 (c) introducir los ADN de la etapa (b) en células hospedadoras y cultivar las células hospedadoras para expresar los ADN; y  
 (d) recoger los productos de expresión de la etapa (c) del cultivo de células hospedadoras.

40 Los métodos de la presente divulgación para purificar un multímero polipeptídico también pueden expresarse como métodos correspondientes que comprenden las etapas de:

- 45 (a) proporcionar un ADN que codifica un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un ADN que codifica un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno;  
 (b) alterar uno o más nucleótidos en uno o ambos ADN de la etapa (a) que codifican los polipéptidos primero y segundo de modo que exista una mayor diferencia de capacidad de unión a proteína A entre el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno;  
 50 (c) introducir los ADN de la etapa (b) en células hospedadoras y cultivar las células hospedadoras para expresar los ADN; y  
 (d) recoger los productos de expresión de la etapa (c) del cultivo de células hospedadoras mediante cromatografía de afinidad con proteína A.

55 En la presente invención, un multímero polipeptídico se refiere a un multímero heteromérico que contiene los polipéptidos primero y segundo. Es preferible que los polipéptidos primero y segundo tengan, cada uno, una actividad de unión a un antígeno diferente. los polipéptidos primero y segundo, que tienen, cada uno, una actividad de unión a antígeno diferente, no están particularmente limitados siempre que uno de los polipéptidos tenga un dominio (secuencia de aminoácidos) de unión a antígeno diferente de aquel del otro polipéptido. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 4 descrita a continuación, un polipéptido puede fusionarse con un dominio de unión a antígeno que es diferente de aquel del otro polipéptido. De manera alternativa, como se muestra en las Figuras 4, 6 y 9 descritas a continuación, un polipéptido puede ser un polipéptido que se une de forma monovalente a un antígeno y que no tiene el dominio de unión a antígeno que posee el otro polipéptido. Los multímeros polipeptídicos que contienen dichos primer y segundo polipéptidos también se incluyen en los multímeros polipeptídicos en contexto con la presente invención.

65

Los multímeros incluyen dímeros, trímeros y tretrámeros, pero no se limitan a los mismos.

En la presente invención, un primer polipéptido y/o un segundo polipéptido pueden formar un multímero con uno o dos terceros polipéptidos.

5 Por lo tanto, la presente divulgación proporciona métodos correspondientes para producir un multímero polipeptídico que comprende un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, y uno o dos terceros polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno, que comprenden las etapas de:

10 (a) expresar un ADN que codifica un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, un ADN que codifica un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un ADN que codifica dos terceros polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno; y  
 (b) recoger los productos de expresión de la etapa (a);

15 o

(a) expresar un ADN que codifica un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, un ADN que codifica un segundo polipéptido que no tiene actividad de unión a antígeno y un ADN que codifica un tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno; y  
 20 (b) recoger los productos de expresión de la etapa (a);

en donde se han modificado uno o más restos de aminoácidos en uno o ambos del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno de modo que existe una mayor diferencia de capacidad de unión a proteína A entre el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno.

Los métodos descritos anteriormente también pueden expresarse como métodos que comprenden las etapas de:

30 (a) proporcionar un ADN que codifica un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, un ADN que codifica un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un ADN que codifica dos terceros polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno;  
 (b) alterar uno o más nucleótidos en uno o ambos ADN de la etapa (a) que codifican los polipéptidos primero y segundo de modo que exista una mayor diferencia de capacidad de unión a proteína A entre el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno;  
 35 (c) introducir los ADN que codifican los polipéptidos primero, segundo y dos terceros en células hospedadoras y cultivar las células hospedadoras para expresar los ADN; y  
 (d) recoger los productos de expresión de la etapa (c) del cultivo de células hospedadoras;

40 o

(a) proporcionar un ADN que codifica un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, un ADN que codifica un segundo polipéptido que no tiene actividad de unión a antígeno y un ADN que codifica un tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno;  
 45 (b) alterar uno o más nucleótidos en uno o ambos ADN de la etapa (a) que codifican los polipéptidos primero y segundo de modo que exista una mayor diferencia de actividad de unión a proteína A entre el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que no tiene actividad de unión a antígeno;  
 (c) introducir los ADN que codifican los polipéptidos primero, segundo y tercero en células hospedadoras y cultivar las células hospedadoras para expresar los ADN; y  
 50 (d) recoger los productos de expresión de la etapa (c) del cultivo de células hospedadoras.

Asimismo, en la presente invención, los polipéptidos primero y segundo pueden formar un multímero con polipéptidos tercero y cuarto.

55 Por lo tanto, la presente divulgación proporciona métodos correspondientes para producir un multímero polipeptídico que comprende un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, un tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, que comprenden las etapas de:

60 (a) expresar un ADN que codifica un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, un ADN que codifica un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un ADN que codifica un tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno; y  
 (b) recoger los productos de expresión de la etapa (a);

65 en donde se han modificado uno o más restos de aminoácidos en uno o ambos del primer polipéptido que tiene una

actividad de unión a antígeno y del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno de modo que existe una mayor diferencia de capacidad de unión a proteína A entre el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno.

5 Los métodos descritos anteriormente también pueden expresarse como métodos que comprenden las etapas de:

(a) proporcionar un ADN que codifica un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, un ADN que codifica un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un ADN que codifica un tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno;

(b) alterar uno o más nucleótidos en uno o ambos ADN de la etapa (a) que codifican los polipéptidos primero y segundo de modo que exista una mayor diferencia de capacidad de unión a proteína A entre el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno;

(c) introducir los ADN que codifican los polipéptidos primero, segundo, tercero y cuarto en células hospedadoras y cultivar las células hospedadoras para expresar los ADN; y

(d) recoger los productos de expresión de la etapa (c) del cultivo de células hospedadoras.

La presente divulgación proporciona métodos correspondientes para purificar un multímero polipeptídico que comprende un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, y uno o dos terceros polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno, que comprenden las etapas de:

(a) expresar un ADN que codifica un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, un ADN que codifica un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un ADN que codifica dos terceros polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno; y

(b) recoger los productos de expresión de la etapa (a);

o

(a) expresar un ADN que codifica un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, un ADN que codifica un segundo polipéptido que no tiene actividad de unión a antígeno y un ADN que codifica un tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno; y

(b) recoger los productos de expresión de la etapa (a);

en donde se han modificado uno o más restos de aminoácidos en uno o ambos del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno de modo que existe una mayor diferencia de capacidad de unión a proteína A entre el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno.

Los métodos descritos anteriormente también pueden expresarse como métodos que comprenden las etapas de:

(a) proporcionar un ADN que codifica un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, un ADN que codifica un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno y un ADN que codifica dos terceros polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno;

(b) alterar uno o más nucleótidos en uno o ambos ADN de la etapa (a) que codifican los polipéptidos primero y segundo de modo que exista una mayor diferencia de capacidad de unión a proteína A entre el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno;

(c) introducir los ADN que codifican los polipéptidos primero, segundo y dos terceros en células hospedadoras y cultivar las células hospedadoras para expresar los ADN; y

(d) recoger los productos de expresión de la etapa (c) del cultivo de células hospedadoras;

o

(a) proporcionar un ADN que codifica un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, un ADN que codifica un segundo polipéptido que no tiene actividad de unión a antígeno y un ADN que codifica un tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno;

(b) alterar uno o más nucleótidos en uno o ambos ADN de la etapa (a) que codifican los polipéptidos primero y segundo de modo que exista una mayor diferencia de capacidad de unión a proteína A entre el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que no tiene actividad de unión a antígeno;

(c) introducir los ADN que codifican los polipéptidos primero, segundo y tercero en células hospedadoras y cultivar las células hospedadoras para expresar los ADN; y

(d) recoger los productos de expresión de la etapa (c) del cultivo de células hospedadoras.

La presente divulgación también proporciona métodos correspondientes para purificar un multímero polipeptídico que comprende un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, un segundo polipéptido que tiene una

actividad de unión a antígeno, un tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, que comprenden las etapas de:

- 5 (a) expresar un ADN que codifica un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, un ADN que codifica un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, un ADN que codifica un tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un ADN que codifica un cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno; y  
 (b) recoger los productos de expresión de la etapa (a) por cromatografía de afinidad con proteína A;

10 en donde se han modificado uno o más restos de aminoácidos en uno o ambos del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno de modo que existe una mayor diferencia de capacidad de unión a proteína A entre el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno.

15 Los métodos descritos anteriormente también pueden expresarse como métodos correspondientes que comprenden las etapas de:

- 20 (a) proporcionar un ADN que codifica un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, un ADN que codifica un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, un ADN que codifica un tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un ADN que codifica un cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno;  
 (b) alterar uno o más nucleótidos en uno o ambos ADN de la etapa (a) que codifican los polipéptidos primero y segundo de modo que exista una mayor diferencia de capacidad de unión a proteína A entre el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno;  
 25 (c) introducir los ADN que codifican los polipéptidos primero, segundo, tercero y cuarto en células hospedadoras y cultivar las células hospedadoras para expresar los ADN; y  
 (d) recoger los productos de expresión de la etapa (c) del cultivo de células hospedadoras mediante cromatografía de afinidad con proteína A.

30 En un multímero polipeptídico en contexto con la presente invención que contiene un primer polipéptido, un segundo polipéptido y uno o dos terceros polipéptidos, los polipéptidos primero y segundo pueden formar, cada uno, un multímero (dímero) con el tercer polipéptido. Asimismo, los dos dímeros resultantes pueden formar un multímero entre sí. Los dos terceros polipéptidos pueden tener completamente la misma secuencia de aminoácidos (pueden tener una actividad de unión al mismo antígeno). De manera alternativa, los terceros polipéptidos pueden tener la misma secuencia de aminoácidos y dos o más actividades (por ejemplo, pueden tener actividades de unión a dos o más antígenos diferentes). Cuando solo está presente un tercer polipéptido, el tercer polipéptido puede formar un multímero polipeptídico mediante dimerización bien con el primer polipéptido o con el segundo polipéptido.

40 En un multímero polipeptídico en contexto con la presente invención, los polipéptidos primero y segundo tienen preferentemente actividad de unión a diferentes antígenos. Entre tanto, el tercer polipéptido puede tener actividad de unión al mismo antígeno que aquel de uno o ambos polipéptidos primero y segundo. De manera alternativa, el tercer polipéptido puede tener actividad de unión a un antígeno diferente de aquellos de los polipéptidos primero y segundo.

45 De manera alternativa, un multímero polipeptídico en contexto con la presente invención puede contener un primer polipéptido, segundo polipéptido, tercer polipéptido y cuarto polipéptido. En dicho multímero polipeptídico, el primer polipéptido y el segundo polipéptido pueden formar un multímero (dímero) con el tercer polipéptido y el cuarto polipéptido, respectivamente. Por ejemplo, a través de la formación de enlaces disulfuro en medio, el primer polipéptido y el tercer polipéptido pueden formar un dímero y el segundo polipéptido y el cuarto polipéptido pueden formar un dímero.

50 En un multímero polipeptídico en contexto con la presente invención, los polipéptidos primero y segundo tienen preferentemente actividad de unión a diferentes antígenos. Entre tanto, el tercer polipéptido puede tener actividad de unión al mismo antígeno que aquel de uno o ambos polipéptidos primero y segundo. De manera alternativa, el tercer polipéptido puede tener actividad de unión a un antígeno diferente de aquellos de los polipéptidos primero y segundo.  
 55 Asimismo, el cuarto polipéptido puede tener actividad de unión al mismo antígeno que aquel de uno o ambos polipéptidos primero y segundo. De manera alternativa, el cuarto polipéptido puede tener actividad de unión a un antígeno diferente de aquellos de los polipéptidos primero y segundo.

60 De manera específica, por ejemplo, cuando los polipéptidos primero y segundo contienen la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de anticuerpo contra el antígeno A y la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de anticuerpo contra el antígeno B, respectivamente, los polipéptidos tercero y cuarto pueden contener la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo contra el antígeno A y la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo contra el antígeno B, respectivamente. Cuando un multímero polipeptídico en contexto con la presente invención tiene polipéptidos tercero y cuarto que contienen dos secuencias de aminoácidos de cadena ligera  
 65 de anticuerpo diferentes, se puede producir o purificar eficazmente un multímero polipeptídico de interés altamente puro haciendo los valores del pI del tercer y cuarto polipéptido diferente usando los métodos descritos a continuación, o

diferenciando su capacidad de unión a proteína L, diferenciando, además, la capacidad de unión a proteína A entre los polipéptidos primero y segundo.

De manera alternativa, por ejemplo, cuando el primer polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de anticuerpo contra el antígeno A, el segundo polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera de anticuerpo contra el antígeno B y la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo, el tercer polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo contra el antígeno A y el cuarto polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de anticuerpo contra el antígeno B y la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera de anticuerpo, también puede producirse o purificarse eficazmente un multímero polipeptídico de interés altamente puro que tiene los polipéptidos primero, segundo, tercero y cuarto usando la presente invención. En este caso, como se describió en el Ejemplo 12 a continuación, la introducción de mutaciones de aminoácidos para alterar el valor del pI de un polipéptido o la introducción de mutaciones de aminoácidos para promover la asociación de polipéptidos de interés (documento WO2006/106905) permite una purificación o producción más eficaz de un multímero polipeptídico de interés que tiene los polipéptidos primero, segundo, tercero y cuarto a mayor pureza. Las mutaciones de aminoácidos a introducir para promover la asociación de polipéptidos pueden ser las utilizadas en los métodos descritos en Protein Eng. julio de 1996, 9(7):617-21; Protein Eng Des Sel. abril de 2010, 23(4):195-202; J Biol Chem. 18 de junio de 2010, 285(25):19637-46; documento WO2009080254; y similares, en los que dos polipéptidos que tienen una región constante de cadena pesada se asocian de forma heteromérica modificando el dominio CH3 de la región constante de cadena pesada; y las utilizadas en los métodos descritos en los documentos WO2009080251, WO2009080252, WO2009080253, y similares, mediante las cuales se promueve la asociación de un par particular de cadena pesada y cadena ligera.

En la presente invención, "polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno" se refiere a un péptido o proteína de cinco o más aminoácidos de longitud que tiene un dominio (región) capaz de unirse a una proteína o péptido tal como un antígeno o ligando, por ejemplo, una región variable de cadena pesada o de cadena ligera, receptor, péptido de fusión receptor- dominio Fc, armazón de anticuerpo o un fragmento de los mismos. De manera específica, un polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno puede contener la secuencia de aminoácidos de una región variable, receptor, péptido de fusión receptor- dominio Fc, armazón de anticuerpos o un fragmento de los mismos.

El armazón puede ser cualquier polipéptido siempre que sea un polipéptido conformacionalmente estable capaz de unirse a al menos un antígeno. Tales polipéptidos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, fragmentos de región variable de anticuerpos, fibronectina, dominios de proteína A, dominios del receptor A de LDL, lipocalinas y las moléculas mencionadas en Nygren et al. (Current Opinion in Structural Biology, 7:463-469 (1997); Journal of Immunol. Methods, 290:3-28 (2004)), Binz et al. (Nature Biotech 23:1257-1266 (2005)), y Hosse et al. (Protein Science 15:14-27 (2006)).

Los expertos en la materia conocen métodos para obtener regiones variables, receptores, péptidos de fusión receptor- dominio Fc, armazón de anticuerpo y fragmentos de los mismos.

Dichos polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno pueden derivar de un organismo vivo o diseñarse artificialmente. Los polipéptidos pueden derivar de proteínas naturales, proteínas sintéticas, proteínas recombinantes y similares. Asimismo, los polipéptidos pueden ser péptidos o fragmentos de proteínas de 10 o más aminoácidos de longitud que tienen un dominio (región) capaz de unirse a una proteína o péptido tal como un antígeno o ligando, siempre que tengan la capacidad de unirse a un antígeno. Los polipéptidos pueden tener más de un dominio capaz de unirse a un antígeno (incluyendo el ligando).

Un polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno también puede denominarse un polipéptido que tiene un dominio o dominios proteicos de unión a antígeno.

En la presente invención, "polipéptido que no tiene actividad de unión a antígeno" se refiere a un péptido o proteína de cinco o más aminoácidos de longitud, tal como un fragmento que no tiene actividad de unión a antígeno, dominio Fc, armazón de anticuerpo o un fragmento de los mismos. De manera específica, un polipéptido que no tiene actividad de unión a antígeno puede contener la secuencia de aminoácidos de una región constante, dominio Fc, armazón de anticuerpo o un fragmento de los mismos, pero la secuencia de aminoácidos no se limita a los ejemplos anteriores. Un polipéptido que no tiene actividad de unión a antígeno puede combinarse con un polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno para producir un multímero polipeptídico que se une de forma monovalente a un antígeno.

En la presente invención, el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno puede contener la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo o la secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo. La secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo o de una región constante de cadena pesada de anticuerpo incluye aquellas de regiones constantes y dominios Fc de tipo IgG humana. Las regiones constantes o los dominios Fc de tipo IgG pueden ser del isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 natural, o pueden ser variantes de los mismos.

Entre tanto, en la presente invención, el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno pueden contener la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera de anticuerpo. La secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera de anticuerpo incluye, pero sin limitación, las regiones constantes de tipo kappa humana y lambda humana y variantes de las mismas.

Asimismo, en la presente invención, los polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno pueden contener la secuencia de aminoácidos de una región variable de anticuerpo (por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, FR1, FR2, FR3 y FR4).

Además, en la presente invención, los polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno pueden contener la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de anticuerpo o de una cadena ligera de anticuerpo. De manera más específica, el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno puede contener la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de anticuerpo. Entre tanto, el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno pueden contener la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo.

Cuando un multímero polipeptídico de interés es un tetrámero que se forma por multimerización entre un dímero formado por los polipéptidos primero y tercero y un dímero formado por los polipéptidos segundo y cuarto, por ejemplo, un polipéptido en el que los polipéptidos primero y segundo que tienen una actividad de unión a antígeno contiene la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de anticuerpo, y un polipéptido en el que los polipéptidos tercero y cuarto que tienen una actividad de unión a antígeno contienen la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo, se puede usar para el multímero polipeptídico en contexto con la presente invención. De manera alternativa, también se puede usar un polipéptido en el que el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno contiene la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de anticuerpo, un polipéptido en el que el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno contiene la secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera de anticuerpo y la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo, un polipéptido en el que el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno contiene la secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo, y un polipéptido en el que el cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno contiene la secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de anticuerpo.

De manera específica, un multímero polipeptídico en contexto con la presente invención puede ser un anticuerpo multiespecífico.

En la presente invención, un "anticuerpo multiespecífico" se refiere a un anticuerpo capaz de unirse específicamente a al menos dos antígenos diferentes.

En la presente invención, "antígenos diferentes" se refiere no solo a diferentes moléculas de antígeno *per se*, sino también a diferentes determinantes antigénicos presentes en las mismas moléculas de antígeno. En consecuencia, por ejemplo, diferentes determinantes antigénicos presentes dentro de una sola molécula se incluyen en los "antígenos diferentes" en contexto con la presente invención. En la presente invención, los anticuerpos que reconocen diversos determinantes antigénicos diferentes en una sola molécula se consideran "anticuerpos capaces de unirse específicamente a antígenos diferentes".

En la presente invención, los anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos biespecíficos capaces de unirse específicamente a dos tipos de antígenos. Los anticuerpos biespecíficos preferidos de la presente invención incluyen anticuerpos IgG de tipo H2L2 (compuestos de dos tipos de cadenas H y dos tipos de cadenas L) que tienen una región constante de IgG humana. De manera más específica, dichos anticuerpos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, anticuerpos quiméricos de tipo IgG, anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos.

Además, un polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno puede ser, por ejemplo, una molécula en la que al menos dos de una región variable de cadena pesada, región variable de cadena ligera, región constante de cadena pesada y región constante de cadena ligera, están unidas entre sí como una cadena simple. De manera alternativa, el polipéptido puede ser un anticuerpo en el que al menos dos de una región variable de cadena pesada, región variable de cadena ligera, dominio Fc (región constante sin dominio CH1) y región constante de cadena ligera, están unidas entre sí como una cadena simple.

En la presente divulgación, la frase "existe una mayor diferencia en la capacidad de unión a proteína A entre polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno" significa que la capacidad de unión a proteína A no es la misma (es diferente) entre dos o más polipéptidos como resultado de modificaciones de aminoácidos en la superficie de polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno. De manera más específica, esta frase significa que, por ejemplo, la capacidad de unión a proteína A del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno es diferente de la del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno. La diferencia de la capacidad de unión a proteína A puede examinarse, por ejemplo, usando cromatografía de afinidad con proteína A.



La fuerza de la capacidad de unión a proteína A de un polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno está correlacionada con el pH del disolvente utilizado para la elución. Cuanto mayor sea la capacidad de unión a proteína A del polipéptido, menor será el pH del disolvente utilizado para la elución. Por lo tanto, la frase "existe una mayor diferencia en la capacidad de unión a proteína A entre los polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno" también se puede expresar como "cuando dos o más polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno se eluyen usando la cromatografía de afinidad con proteína A, cada polipéptido se eluye a un pH de disolvente diferente". La diferencia en el pH del disolvente de elución es 0,1 o más, preferentemente 0,5 o más, y aún más preferentemente 1,0 o más, pero sin limitación a esto.

Asimismo, en la presente divulgación, es preferible alterar la capacidad de unión a proteína A sin disminuir otras actividades (por ejemplo, retención en plasma) de los polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno.

Un multímero polipeptídico de interés que comprende el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno puede producirse o purificarse usando cromatografía de afinidad con proteína A basándose en la diferencia de capacidad de unión a proteína A entre el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno. De manera específica, por ejemplo, cuando el multímero polipeptídico en contexto con la presente invención es un anticuerpo biespecífico que tiene una cadena L común (es decir, la misma secuencia de aminoácidos en los polipéptidos tercero y cuarto), el multímero polipeptídico puede producirse o purificarse mediante el método descrito a continuación. En primer lugar, las células hospedadoras se introducen con lo siguiente: un ácido nucleico que codifica el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno (más específicamente, la primera cadena pesada del anticuerpo) cuyo aminoácido en la posición 435 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de anticuerpo es arginina (R); un ácido nucleico que codifica el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno (más específicamente, la segunda cadena pesada del anticuerpo) cuyo aminoácido en la posición 435 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo es histidina (H); y un ácido nucleico que codifica el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno (cadena L común). Las células se cultivan para expresar los ADN de forma transitoria. Después, los productos de expresión resultantes se cargan en una columna de proteína A. Después del lavado, la elución se realiza primero con una solución de elución de pH alto y después con una solución de elución de pH bajo. Un anticuerpo homomérico que comprende dos unidades de la primera cadena pesada del anticuerpo y dos unidades de la cadena L común no tiene ningún sitio de unión a proteína A en su región constante de cadena pesada. Entre tanto, un anticuerpo biespecífico que comprende la primera cadena pesada del anticuerpo, la segunda cadena pesada del anticuerpo, y dos unidades de la cadena L común tienen un único sitio de unión a la proteína A en su región constante de cadena pesada. Un anticuerpo homomérico que comprende dos unidades de la segunda cadena pesada del anticuerpo y dos unidades de la cadena L común tiene dos sitios de unión a proteína A en su región constante de cadena pesada. Tal como se ha descrito anteriormente, la capacidad de unión a proteína A de un polipéptido se correlaciona con el pH del disolvente para eluir el polipéptido en la cromatografía de afinidad con proteína A. Cuanto mayor sea la capacidad de unión a la proteína A, menor será el pH del disolvente para la elución. Por lo tanto, cuando la elución se lleva a cabo primero con una solución de elución de pH alto y después con una solución de elución de pH bajo, los anticuerpos se eluyen en el siguiente orden:

- un anticuerpo homomérico que comprende dos unidades de la primera cadena pesada de anticuerpo y dos unidades de la cadena L común
- un anticuerpo biespecífico que comprende la primera cadena pesada de anticuerpo, la segunda cadena pesada de anticuerpo y dos unidades de la cadena L común
- un anticuerpo homomérico que comprende dos unidades de la segunda cadena pesada de anticuerpo y dos unidades de la cadena L común

Esto permite la producción o purificación de los multímeros polipeptídicos (anticuerpos biespecíficos) de interés.

La pureza de los multímeros polipeptídicos obtenidos por los métodos de producción o purificación de la presente invención es preferentemente al menos del 95 % o mayor (por ejemplo, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor).

Las modificaciones de los restos de aminoácidos para crear una diferencia en la capacidad de unión a proteína A entre el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno incluyen, pero sin limitación:

- (1) modificación de uno o más restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, de modo que aumenta la capacidad de unión a proteína A de uno de los polipéptidos;
- (2) modificación de uno o más restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, de modo que disminuye la capacidad de unión a proteína A de uno de los polipéptidos;

A de uno de los polipéptidos; y

(3) modificación de uno o más restos de aminoácidos en el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y en el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, de modo que aumenta la capacidad de unión a proteína A de uno cualquiera del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, y disminuye la capacidad de unión a proteína A del otro polipéptido.

En la presente divulgación, se prefiere que se modifiquen los aminoácidos en la superficie de un polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno. Asimismo, también se prefiere considerar reducir la influencia de la modificación en otras actividades del polipéptido.

En consecuencia, en la presente divulgación, se prefiere modificar, por ejemplo, los restos de aminoácidos en las siguientes posiciones (numeración EU) en el dominio Fc del anticuerpo o en la región constante de cadena pesada:

15 TLMISR en las posiciones 250-255, VLHQDWLNGK en las posiciones 308-317 y EALHNHY en las posiciones 430-436;  
preferentemente, TLMIS en las posiciones 250-254, LHQD en las posiciones 309-312, LN en las posiciones 314 y 315, E en la posición 430 y LHNHY en las posiciones 432-436;  
20 más preferentemente, LMIS en las posiciones 251-254, LHQ en las posiciones 309-311, L en la posición 314 y LHNH en las posiciones 432-435; y en particular, MIS en las posiciones 252-254, L en la posición 309, Q en la posición 311 y NHY en las posiciones 434-436.

En cuanto a las modificaciones de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de anticuerpo, los sitios de mutación preferidos incluyen FR1, CDR2 y FR3. Los sitios de mutación más preferidos incluyen, por ejemplo, las posiciones H15-H23, H56-H59, H63-H72 y H79-H83 (numeración EU).

De las modificaciones de aminoácidos anteriores, se prefieren más las modificaciones que no reducen la unión a FcRn o la retención en plasma en ratones transgénicos con FcRn humano.

De manera más específica, las modificaciones que aumentan la capacidad de unión a la proteína A de un polipéptido incluyen, pero sin limitación, sustitución de histidina (His) por el resto de aminoácido en la posición 435 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo o una región constante de cadena pesada de anticuerpo.

Entre tanto, las modificaciones que reducen la capacidad de unión a la proteína A de un polipéptido incluyen, pero sin limitación, sustitución de arginina por el resto de aminoácido en la posición 435 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo o una región constante de cadena pesada de anticuerpo.

En cuanto a la región variable de cadena pesada de anticuerpo, la región variable de la cadena pesada de la subclase VH3 tiene actividad de unión a proteína A. Por lo tanto, para aumentar la capacidad de unión a proteína A, las secuencias de aminoácidos en los sitios de modificación anteriores son preferentemente idénticas a las de la región variable de la cadena pesada de la subclase VH3. Para reducir la capacidad de unión a proteína A, las secuencias de aminoácidos son preferentemente idénticas a las de la región variable de cadena pesada de otra subclase.

Como se describe a continuación, la modificación de los restos de aminoácidos se puede lograr alterando uno o más nucleótidos en un ADN que codifica un polipéptido y expresando el ADN en las células hospedadoras. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente el número, el sitio y el tipo de nucleótidos alterados dependiendo del tipo de restos de aminoácidos después de la modificación.

En el presente documento, la modificación (alteración) se refiere a la sustitución, eliminación, adición o inserción, o combinaciones de las mismas.

El polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno puede comprender otras modificaciones además de las modificaciones anteriores de restos de aminoácidos. Dichas modificaciones adicionales se pueden seleccionar de, por ejemplo, sustituciones, eliminaciones y modificaciones de aminoácidos, y combinaciones de las mismas. De manera específica, todos los polipéptidos cuyas secuencias de aminoácidos comprenden una modificación descrita a continuación se incluyen en la presente invención:

- modificación de aminoácidos para aumentar la tasa de asociación heteromérica de dos tipos de cadenas H en un anticuerpo biespecífico
- modificación de aminoácidos para estabilizar los enlaces disulfuro entre el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno
- modificación de aminoácidos para mejorar la retención en plasma de un anticuerpo
- modificación para aumentar la estabilidad en condiciones ácidas
- modificación para reducir la heterogeneidad

- modificación para suprimir la reacción de desamidación
- modificación para introducir una diferencia entre los puntos isoeléctricos de dos tipos de polipéptidos
- modificación para alterar la capacidad de unión al receptor Fcγ

5 Estas modificaciones de aminoácidos se describen a continuación.

Modificación de aminoácidos para aumentar la tasa de asociación heteromérica de dos tipos de cadenas H en un anticuerpo biespecífico

10 Las modificaciones de aminoácidos en contexto con la presente invención se pueden combinar con las modificaciones de aminoácidos descritas en el documento WO2006106905. No hay limitación en los sitios de modificación siempre que los aminoácidos formen la interfaz entre dos polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno. De manera específica, por ejemplo, cuando se modifica una región constante de cadena pesada, tales modificaciones incluyen modificaciones que hacen que los aminoácidos de al menos una de las combinaciones de las posiciones 356 y 439, las posiciones 357 y 370 y las posiciones 399 y 409 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno tengan la misma carga eléctrica; y los aminoácidos de al menos una de las combinaciones de las posiciones 356 y 439, las posiciones 357 y 370, y las posiciones 399 y 409 (numeración EU) en la región constante de cadena pesada del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene una actividad de unión a antígeno tengan una carga eléctrica opuesta a la del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno. De manera más específica, dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, introducción de una mutación que sustituye la Glu en la posición 356 (numeración EU) con Lys en la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada de uno cualquiera del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y una mutación que sustituye la Lys en la posición 439 (numeración EU) con Glu en la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada del otro polipéptido. Cuando estas modificaciones se combinan con las modificaciones en contexto con la presente invención, el polipéptido de interés se puede obtener con una pureza más alta por purificación basada en proteína A sola.

De manera alternativa, el multímero polipeptídico de interés que comprende los polipéptidos primero, segundo, tercero y cuarto que tienen una actividad de unión a antígeno puede producirse o purificarse eficazmente a una pureza superior, cuando se realiza una modificación para hacer que los aminoácidos en la posición 39 (numeración de Kabat) en la región variable de cadena pesada y/o en la posición 213 (numeración EU) en la región constante de cadena pesada del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno tengan una carga eléctrica opuesta a la del aminoácido en la posición 39 (numeración de Kabat) en la región variable de cadena pesada y/o el aminoácido en la posición 213 (numeración EU) en la región constante de cadena pesada del segundo polipéptido que tiene una unión a antígeno actividad o que no tiene actividad de unión a antígeno y el aminoácido en la posición 38 (numeración de Kabat) y/o el aminoácido en la posición 123 (numeración EU) en la región variable de cadena ligera del tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno tenga una carga eléctrica opuesta al del aminoácido en la posición 38 (numeración de Kabat) y/o al aminoácido en la posición 123 (numeración EU) en la región variable de cadena ligera del cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno.

Modificación de aminoácidos para estabilizar los enlaces disulfuro entre el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno

45 Como se describe en los documentos publicados (Mol. Immunol. 1993, 30, 105-108; y Mol. Immunol. 2001, 38, 1-8), se elimina la heterogeneidad de IgG4 y se puede mantener su estructura estable sustituyendo Pro por Ser en la posición 228 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada de IgG4.

Modificación de aminoácidos para mejorar la retención en plasma de un anticuerpo

Para regular la retención de plasma, es posible combinar las modificaciones de aminoácidos en contexto con la presente invención con modificaciones de aminoácidos que alteran el valor del pI del anticuerpo. Las modificaciones en regiones constantes incluyen, por ejemplo, modificaciones de aminoácidos en las posiciones 250 y 428 (numeración EU) y las descritas en documentos publicados (J. Immunol. 2006, 176 (1):346-356; y Nat. Biotechnol. 1997 15 (7):637-640). Las modificaciones a las regiones variables incluyen las modificaciones de aminoácidos descritas en los documentos WO2007/114319 y WO2009/041643. Los aminoácidos a modificar se exponen preferentemente en la superficie de un polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, la sustitución de aminoácidos en la posición 196 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada. En el caso de la región constante de la cadena pesada de IgG4, la retención en plasma se puede potenciar, por ejemplo, sustituyendo glutamina por lisina en la posición 196, reduciendo así el valor del pI.

Asimismo, la retención en plasma se puede regular alterando la capacidad de unión a FcRn. Las modificaciones de aminoácidos que alteran la capacidad de unión a FcRn incluyen, por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos en la región constante de cadena pesada de anticuerpo descritas en documentos publicados (The Journal of Biological Chemistry vol.276, N.º 9 6591-6604, 2001; Molecular Cell, Vol.7, 867-877, 2001; Curr Opin Biotechnol. 2009, 20

(6):685-91). Dichas sustituciones de aminoácidos incluyen, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 233, 238, 253, 254, 255, 256, 258, 265, 272, 276, 280, 285, 288, 290, 292, 293, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 315, 317, 329, 331, 338, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 415, 424, 433, 434, 435 y 436 (numeración EU).

5 Modificación para mejorar la estabilidad en condiciones ácidas

10 Cuando se usa la región constante de cadena pesada de IgG4, la estructura estable de cuatro cadenas (estructura H2L2) se mantiene preferentemente suprimiendo la conversión de IgG4 en la forma de media molécula en condiciones ácidas. Por lo tanto, la arginina en la posición de aminoácidos 409 (sistema de numeración EU) que desempeña un papel importante en el mantenimiento de la estructura de cuatro cadenas (Immunology 2002, 105, 9-19) se sustituye preferentemente con lisina del tipo IgG1 que mantiene una estructura de cuatro cadenas estable incluso en condiciones ácidas. Asimismo, para mejorar la estabilidad ácida de la IgG2, la metionina en la posición de aminoácido 397 (sistema de numeración EU) puede sustituirse con valina. Estas modificaciones pueden usarse en combinación con las modificaciones de aminoácidos en contexto con la presente invención.

15 Modificación para reducir la heterogeneidad

20 Las modificaciones de aminoácidos en contexto con la presente invención pueden combinarse con los métodos descritos en el documento WO2009041613. De manera específica, por ejemplo, la modificación en la que se eliminan los dos aminoácidos en el extremo C de la región constante de cadena pesada de IgG1 (es decir, glicina y lisina en las posiciones 446 y 447 [numeración EU], respectivamente) se puede combinar con las modificaciones de aminoácidos descritas en los Ejemplos en el presente documento.

25 Modificación para suprimir la reacción de desamidación

30 Las modificaciones de aminoácidos en contexto con la presente invención pueden combinarse con modificaciones de aminoácidos para suprimir la reacción de desamidación. Se ha indicado que la reacción de desamidación e produce con mayor frecuencia en un sitio donde la asparagina (N) y la glicina (G) están adyacentes entre sí (--- NG ---) (Geiger et al., J. Bio. Chem. (1987) 262:785-794). Cuando un multímero polipeptídico (anticuerpo multiespecífico) en contexto con la presente invención tiene un sitio donde la asparagina y la glicina son adyacentes entre sí, la reacción de desamidación puede suprimirse modificando la secuencia de aminoácidos. De manera específica, por ejemplo, una o ambas de asparagina y glicina se sustituyen con otros aminoácidos. De manera más específica, por ejemplo, la asparagina se sustituye con ácido aspártico.

35 Modificación para introducir una diferencia en el punto isoeléctrico entre dos tipos de polipéptidos

40 Las modificaciones de aminoácidos en contexto con la presente invención pueden combinarse con modificaciones de aminoácidos para introducir una diferencia en el punto isoeléctrico. Se describen métodos específicos, por ejemplo, en el documento WO2007/114325. Además de las modificaciones en contexto con la presente invención, las secuencias de aminoácidos del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno se modifican para que haya una mayor diferencia en el punto isoeléctrico entre estos polipéptidos. Esto permite la producción o purificación eficaz del polipéptido de interés a una mayor pureza. Asimismo, se puede producir una diferencia mayor en el punto isoeléctrico entre el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno. Esto permite que el multímero polipeptídico de interés que comprende los polipéptidos primero, segundo, tercero y cuarto se produzca o purifique de manera eficaz a una pureza superior. De manera específica, cuando los polipéptidos primero y segundo comprenden cada uno una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de anticuerpo, los sitios de modificación incluyen, por ejemplo, las posiciones 1, 3, 5, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 19, 23, 25, 26, 39, 42, 43, 44, 46, 68, 71, 72, 73, 75, 76, 81, 82b, 83, 85, 86, 105, 108, 110 y 112 (numeración de Kabat). cuando los polipéptidos tercero y cuarto comprenden cada uno una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo, los sitios de modificación incluyen, por ejemplo, las posiciones 1, 3, 7, 8, 9, 11, 12, 16, 17, 18, 20, 22, 38, 39, 41, 42, 43, 45, 46, 49, 57, 60, 63, 65, 66, 68, 69, 70, 74, 76, 77, 79, 80, 81, 85, 100, 103, 105, 106, 107 y 108 (numeración de Kabat). Se puede producir una diferencia mayor en el punto isoeléctrico modificando al menos uno de los restos de aminoácidos en las posiciones anteriores en un polipéptido para que tenga una carga eléctrica, y modificando al menos uno de los restos de aminoácidos en las posiciones anteriores en el otro polipéptido para que no tenga carga o que tenga carga eléctrica opuesta a la anterior.

55 Modificación para alterar la capacidad de unión al receptor Fcγ

60 Las modificaciones de aminoácidos en contexto con la presente invención pueden combinarse con modificaciones de aminoácidos que alteran (aumentan o reducen) la capacidad de unión al receptor de Fcγ. Las modificaciones para alterar la capacidad de unión al receptor Fcγ incluyen, pero sin limitación, las modificaciones descritas en Curr Opin Biotechnol. 2009, 20(6):685-91. De manera específica, la capacidad de unión al receptor Fcγ se puede alterar, por ejemplo, combinando las modificaciones en contexto con la presente invención con una modificación que sustituye la leucina en las posiciones 234 y 235 y la asparagina en la posición 272 (numeración EU) de una región constante de cadena pesada de IgG1 con otros aminoácidos. Los aminoácidos después de la sustitución incluyen, pero sin

limitación, alanina.

A continuación se describe la preparación de ADN que codifican polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno, la modificación de uno o más nucleótidos, la expresión de los ADN y la recuperación de productos de expresión

Preparación de ADN que codifican polipéptidos que tienen actividad de unión a antígeno

En la presente invención, un ADN que codifica un polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o un polipéptido que no tiene actividad de unión a antígeno puede ser la totalidad o una parte de una secuencia conocida (secuencia de origen natural o artificial), o sus combinaciones. Tales ADN se pueden obtener por métodos conocidos por los expertos en la materia. Los ADN pueden aislarse, por ejemplo, de bibliotecas de anticuerpos, o clonando genes que codifican anticuerpos a partir de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales.

Con respecto a las bibliotecas de anticuerpos, muchas ya son bien conocidas, y los expertos en la materia pueden obtener apropiadamente bibliotecas de anticuerpos ya que se conocen métodos para producir bibliotecas de anticuerpos. Por ejemplo, con respecto a las bibliotecas de fagos de anticuerpos, se puede consultar la bibliografía tal como Clackson et al., Nature 1991, 352: 624-8; Marks et al., J. Mol. Biol. 1991, 222: 581-97; Waterhouses et al., Nucleic Acids Res. 1993, 21: 2265-6; Griffiths et al., EMBO J. 1994, 13: 3245-60; Vaughan et al., Nature Biotechnology 1996, 14: 309-14; o la publicación de Patente Japonesa Kohyo N.º (JP-A) H20-504970 (publicación en fase nacional japonesa no examinada correspondiente a una publicación internacional no japonesa). Además, pueden usarse métodos conocidos tales como métodos que usan células eucariotas como bibliotecas (WO95/15393) y métodos de presentación en ribosomas. Asimismo, Además, también se conocen técnicas para obtener anticuerpos humanos mediante la selección usando bibliotecas de anticuerpos humanos. Por ejemplo, las regiones variables de anticuerpos humanos se pueden expresar en la superficie de los fagos como anticuerpos de cadena sencilla (scFv) usando métodos de presentación en fagos y se pueden seleccionar fagos que se unen a antígenos. El análisis genético de los fagos seleccionados puede determinar las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de los anticuerpos humanos que se unen a los antígenos. Una vez que se revelan las secuencias de ADN de scFv que se unen a los antígenos, se pueden producir vectores de expresión adecuados basándose en estas secuencias para obtener anticuerpos humanos. Estos métodos ya son bien conocidos, y se pueden consultar los documentos WO92/01047, WO92/20791, WO93/06213, WO93/11236, WO93/19172, WO95/01438 y WO95/15388.

En cuanto a los métodos para obtener genes que codifican anticuerpos a partir de hibridomas, básicamente, se pueden usar técnicas conocidas. De manera específica, los antígenos deseados o las células que expresan los antígenos deseados se usan como antígenos sensibilizantes para la inmunización según los métodos de inmunización convencionales. Las células inmunitarias así obtenidas se fusionan con células precursoras conocidas por métodos de fusión celular ordinarios, y las células productoras de anticuerpos monoclonales (hibridomas) se exploran por métodos de exploración ordinarios. Los ADNc de las regiones variables de anticuerpo (regiones V) se pueden obtener mediante la transcripción inversa de los ARNm de los hibridomas obtenidos utilizando la transcriptasa inversa. Los genes que codifican los anticuerpos se pueden obtener uniéndolos con los ADN que codifican las regiones constantes de anticuerpos (regiones C) deseadas.

De manera más específica, sin limitaciones, los siguientes métodos son ejemplos.

Los antígenos sensibilizantes para obtener los genes de anticuerpos que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo incluyen tanto antígenos completos con inmunogenicidad como antígenos incompletos compuestos de haptenos y tales que no muestran antigenicidad. Por ejemplo, se pueden usar proteínas de longitud completa y péptidos parciales de proteínas de interés. Además, se sabe que las sustancias compuestas de polisacáridos, ácidos nucleicos, lípidos y similares pueden convertirse en antígenos. Por lo tanto, no hay limitaciones particulares sobre los antígenos en la presente invención. Los antígenos pueden prepararse por métodos conocidos por los expertos en la materia, y pueden prepararse, por ejemplo, por los siguientes métodos usando baculovirus (por ejemplo, el documento WO98/46777). Se pueden producir hibridomas, por ejemplo, los siguientes métodos de Milstein *et al.* (G. Kohler y C. Milstein, Métodos Enzymol. 1981, 73: 3-46) y similares. Cuando la inmunogenicidad de un antígeno es baja, se puede unir a una macromolécula que tiene inmunogenicidad, tal como la albúmina y después se usa para la inmunización. Asimismo, al unir los antígenos con otras moléculas si es necesario, se pueden convertir en antígenos solubles. Cuando las moléculas transmembrana, tal como los receptores, se usan como antígenos, las porciones de las regiones extracelulares de los receptores pueden usarse como un fragmento, o las células que expresan moléculas transmembrana en su superficie celular pueden usarse como inmunógenos.

Las células productoras de anticuerpos pueden obtenerse inmunizando animales usando los antígenos sensibilizantes adecuados descritos anteriormente. De manera alternativa, las células productoras de anticuerpos pueden prepararse mediante inmunización *in vitro* de linfocitos que pueden producir anticuerpos. Se pueden usar varios mamíferos como animales para la inmunización, donde generalmente se usan roedores, lagomorfos y primates. Ejemplos de tales animales incluyen ratones, ratas y hamsters para roedores, conejos para lagomorfos y monos, incluidos el mono cynomolgus, el mono rhesus, los hamadriades y los chimpancés para primates. Además, también se conocen animales transgénicos que portan repertorios de genes de anticuerpos humanos, y se pueden obtener anticuerpos

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

La inmunización animal se puede llevar a cabo diluyendo y suspendiendo adecuadamente un antígeno sensibilizante en Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS), solución salina fisiológica o similares, y formando una emulsión mezclando un adyuvante si es necesario, seguido de una inyección intraperitoneal o subcutánea en los animales. Después de eso, el antígeno sensibilizante mezclado con el adyuvante incompleto de Freund se administra preferentemente varias veces cada cuatro a 21 días. La producción de anticuerpos puede confirmarse midiendo el título de anticuerpos diana en sueros animales usando métodos convencionales.

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

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

En el presente documento, es posible modificar genes que codifican cadenas pesadas y genes que codifican cadenas ligeras utilizando técnicas de ingeniería genética. Los anticuerpos genéticamente modificados, tal como los anticuerpos quiméricos, los anticuerpos humanizados que se han modificado artificialmente con el fin de disminuir la antigenicidad heteróloga y contra los humanos, se pueden producir de manera apropiada si es necesario para anticuerpos tales como anticuerpos de ratón, anticuerpos de rata, anticuerpos de conejo, anticuerpos de hámster, anticuerpos de oveja y anticuerpos de camello. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos compuestos de regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo de mamífero no humano, tal como anticuerpo de ratón, y las regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo humano. Se pueden obtener uniendo el ADN que codifica una región variable de un anticuerpo de ratón al ADN que codifica una región constante de un anticuerpo humano, incorporándolos en un vector de expresión e introduciendo el vector en un hospedador para la producción del anticuerpo. Un anticuerpo humanizado, que también se denomina anticuerpo humano reformado, se puede sintetizar mediante PCR a partir de una serie de oligonucleótidos producidos para que tengan partes solapantes en los extremos de las secuencias de ADN diseñadas para unir las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo de un mamífero no humano tal como un ratón. El ADN obtenido puede unirse a un ADN que codifica una región constante de anticuerpo humano. El ADN unido puede incorporarse en un vector de expresión, y el vector puede introducirse en un hospedador para producir el anticuerpo (véase los documentos EP239400 y WO96/02576). Las FR de anticuerpos humanos que se unen a través de la CDR se seleccionan cuando la CDR forma un sitio de unión a antígeno favorable. Si es necesario, los aminoácidos en la región marco de una región variable de anticuerpo pueden sustituirse de modo que la CDR del anticuerpo humano reformado forme un sitio de unión a antígeno apropiado (K. Sato et al., Cancer Res. 1993, 53: 851-856). Los anticuerpos monoclonales en contexto con la presente invención incluyen tales anticuerpos humanizados y anticuerpos quiméricos.

Cuando los anticuerpos en contexto con la presente invención son anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados, las regiones constantes de estos anticuerpos derivan preferentemente de anticuerpos humanos. Por ejemplo, se pueden usar Cy1, Cy2, Cy3 y Cy4 para la cadena pesada, mientras que se pueden usar Ck y Cl para la cadena ligera. Asimismo, la región constante del anticuerpo humano puede modificarse según sea necesario para mejorar el anticuerpo o su estabilidad de producción. Un anticuerpo quimérico en contexto con la presente invención comprende preferentemente una región variable de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano y una región constante de un anticuerpo humano. Entre tanto, un anticuerpo humanizado en contexto con la presente invención comprende preferentemente CDR de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano, y regiones FR y C de un anticuerpo

humano. Las regiones constantes derivadas de los anticuerpos humanos comprenden secuencias de aminoácidos específicas, que varían según el isotipo, tal como IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgM, IgA, IgD e IgE. Las regiones constantes usadas para preparar los anticuerpos humanizados en contexto con la presente invención pueden ser regiones constantes de anticuerpos de cualquier isotipo. Se usa preferentemente una región constante de IgG humana, pero las regiones constantes no están limitadas a las mismas. Entre tanto, no existe una limitación particular en las FR derivadas de anticuerpos humanos que se usan para preparar anticuerpos humanizados, y pueden derivar de un anticuerpo de cualquier isotipo.

Las regiones variables y constantes de anticuerpos quiméricos o humanizados en contexto con la presente invención pueden modificarse por eliminación, sustitución, inserción y/o adición, siempre que los anticuerpos muestren la misma especificidad de unión que los anticuerpos originales.

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

En la presente divulgación, los aminoácidos pueden modificarse para alterar las propiedades biológicas de un anticuerpo.

Los minicuerpos (anticuerpos de bajo peso molecular) son útiles como anticuerpos debido a sus propiedades cinéticas *in vivo* y a su bajo coste de producción utilizando *E. coli*, células vegetales o similares.

Los fragmentos de anticuerpos son un tipo de minicuerpo. Los minicuerpos incluyen anticuerpos que comprenden un fragmento de anticuerpo como su estructura parcial. Los minicuerpos en contexto con la presente invención no están particularmente limitados por su estructura o método de producción, siempre que tengan capacidad de unión a antígeno. Algunos minicuerpos tienen una actividad mayor que la de un anticuerpo completo (Orita et al., Blood (2005) 105: 562-566). En el presente documento, "los fragmentos de anticuerpos" no están particularmente limitados siempre que sean una parte de un anticuerpo completo (por ejemplo, IgG completa). Sin embargo, los fragmentos de anticuerpos comprenden preferentemente una región variable de cadena pesada (VH) o una región variable de cadena ligera (VL). Los fragmentos de anticuerpos preferidos incluyen, por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab' y Fv. La secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada (VH) o de una región variable de cadena ligera (VL) en un fragmento de anticuerpo puede modificarse mediante sustitución, eliminación, adición y/o inserción. Asimismo, pueden eliminarse algunas partes de una región variable de cadena pesada (VH) o de una región variable de cadena ligera (VL), siempre que los fragmentos conserven su capacidad de unión a antígeno. Por ejemplo, de los fragmentos de anticuerpos anteriores, "Fv" es un fragmento de anticuerpo mínimo que comprende los sitios completos de reconocimiento y unión a antígeno. "Fv" es un dímero (dímero VH-VL) en el que una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) están estrechamente unidas por enlaces no covalentes. Las tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cada región variable forman un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Seis CDR confieren un sitio de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso una región variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas de antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque su afinidad es menor que la del sitio de unión completo. Por lo tanto, tales moléculas que son más pequeñas que Fv también se incluyen en los fragmentos de anticuerpos en contexto con la presente invención. Asimismo, las regiones variables de un fragmento de anticuerpo pueden estar quimerizadas o humanizadas.

Es preferible que los minicuerpos comprendan tanto una región variable de cadena pesada (VH) como una región variable de cadena ligera (VL). Los minicuerpos incluyen, por ejemplo, fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, y scFv (Fv de cadena sencilla) que pueden prepararse usando fragmentos de anticuerpos (Huston et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA (1988) 85: 5879-83; Plickthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies" Vol. 113, Resenburger y Moore (eds.), Springer Verlag, Nueva York, págs. 269-315, (1994)); diacuerpos (Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90:6444-8; los documentos EP 404097; WO93/11161; Johnson et al., Method in Enzymology (1991) 203: 88-98; Holliger et al., Protein Engineering (1996) 9:299-305; Perisic et al., Structure (1994) 2:1217-26; John et al., Protein Engineering (1999) 12(7):597-604; Atwell et al., Mol. Immunol. (1996) 33:1301-12); sc(Fv)<sub>2</sub> (Hudson et al., J Immunol. Methods (1999) 231:177-89; Orita et al., Blood (2005) 105:562-566); triacuerpos (Journal of Immunological Methods (1999) 231: 177-89); y diacuerpos en tándem (Cancer Research (2000) 60:4336-41).

Se puede preparar un fragmento de anticuerpo tratando un anticuerpo con una enzima, por ejemplo, una proteasa tal como papaína y pepsina (véase Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods (1992) 24:107-17; Brennan et al., Science (1985) 229:81). De manera alternativa, también se puede producir un fragmento de anticuerpo mediante recombinación genética basándose en su secuencia de aminoácidos.

Un minicuerpo que comprende una estructura que es el resultado de la modificación de un fragmento de anticuerpo puede construirse usando un fragmento de anticuerpo obtenido mediante tratamiento enzimático o recombinación genética. De manera alternativa, después de construir un gen que codifica un minicuerpo completo e introducirlo en un vector de expresión, el minicuerpo puede expresarse en células hospedadoras apropiadas (véanse, por ejemplo,

Co et al., J. Immunol. (1994) 152:2968-76; Better y Horwitz, Methods Enzymol. (1989) 178:476-96; Pluckthun y Skerra, Methods Enzymol. (1989) 178: 497-515; Lamoyi, Methods Enzymol. (1986) 121:652-63; Rousseaux et al., Methods Enzymol. (1986) 121:663-9; Bird y Walker, Trends Biotechnol. (1991) 9:132-7).

5 El scFv anterior es un polipéptido de cadena sencilla que comprende dos regiones variables unidas entre sí a través de un enlazador o similares, según sea necesario. Las dos regiones variables contenidas en un scFv son generalmente una VH y una VL, pero un scFv puede tener dos VH o dos VL. En general, los polipéptidos scFv comprenden un enlazador entre los dominios VH y VL, formando así una porción emparejada de VH y VL necesaria para la unión a antígeno. Un enlazador peptídico de diez o más aminoácidos se usa generalmente como el enlazador entre VH y VL para formar una porción emparejada intramolecularmente entre VH y VL. Sin embargo, los enlazadores del scFv en contexto con la presente invención no se limitan a dichos enlazadores peptídicos, siempre que no inhiban la formación de scFv. Para revisar scFv, véase Pluckthun "The Pharmacology of Monoclonal Antibody", Vol. 113 (Rosenburg y Moore ed., Springer Verlag, NY, págs. 269-315 (1994)).

15 Entre tanto, "diacuerpos (Db)" se refiere a fragmentos de anticuerpos divalentes contruidos por fusión génica (P. Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993); los documentos EP 404.097; WO93/11161; etc.). Los diacuerpos son dímeros que comprenden dos cadenas de polipéptidos, en las que cada cadena de polipéptidos comprende dentro de la misma cadena una región variable de cadena ligera (VL) y una región variable de cadena pesada (VH) unidas a través de un enlazador lo suficientemente corto como para evitar la interacción de estos dos dominios, por ejemplo, un enlazador de aproximadamente cinco restos. VL y VH codificadas en la misma cadena polipeptídica formarán un dímero porque el enlazador entre VL y VH es demasiado corto para formar un fragmento de región V de cadena sencilla. Por lo tanto, los diacuerpos tienen dos sitios de unión a antígeno. En este caso, cuando VL y VH dirigidas contra dos epítomos diferentes (a y b) se expresan simultáneamente como combinaciones de VL<sub>a</sub>-VH<sub>b</sub> y VL<sub>b</sub>-VH<sub>a</sub> conectadas con un enlazador de aproximadamente cinco restos, se secretan como Db biespecíficos.

25 Los diacuerpos comprenden dos moléculas de scFv y, por lo tanto, tienen cuatro regiones variables. Como resultado, los diacuerpos tienen dos sitios de unión a antígeno. A diferencia de las situaciones en las que scFv no forma dímeros, en la formación de diacuerpos, la longitud del enlazador entre la VH y la VL en cada molécula scFv es generalmente de aproximadamente cinco aminoácidos cuando el enlazador es un enlazador peptídico. Sin embargo, el enlazador de scFv que forma un diacuerpo no se limita a dicho enlazador peptídico, siempre que no inhiba la expresión de scFv y la formación de diacuerpos.

30 Asimismo, es preferible que los minicuerpos y fragmentos de anticuerpos en contexto con la presente invención comprendan adicionalmente una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo y/o una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera.

Alteración de uno o más nucleótidos

40 En el presente documento, "alteración de nucleótidos" significa que la manipulación genética o mutagénesis se realiza para insertar, eliminar o sustituir al menos un nucleótido en un ADN de modo que el polipéptido codificado por el ADN tenga restos de aminoácidos de interés. De manera específica, esto significa que el codón que codifica el resto de aminoácido original está sustituido con un codón que codifica el resto de aminoácido de interés. Dichas alteraciones de nucleótidos pueden introducirse usando métodos tales como mutagénesis dirigida al sitio (véase, por ejemplo, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488), mutagénesis por PCR y mutagénesis en casete. En general, los anticuerpos mutantes cuyas propiedades biológicas se han mejorado muestran una homología y/o similitud de secuencia de aminoácidos del 70 % o mayor, más preferentemente del 80 % o mayor, e incluso más preferentemente del 90 % o mayor (por ejemplo, 95 % o mayor, 97 %, 98 %, 99 %, etc.), en comparación con la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo original. En el presente documento, la homología y/o similitud de secuencia se define como la proporción de restos de aminoácidos que son homólogos (el mismo resto) o similares (restos de aminoácidos clasificados en el mismo grupo basándose en las propiedades generales de las cadenas laterales de aminoácidos) a los restos de aminoácidos originales, después de maximizar el valor de la homología de secuencia realizando la alineación de secuencia y la introducción de huecos según sea necesario. En general, los restos de aminoácidos de origen natural se clasifican en los siguientes grupos basándose en las características de sus cadenas laterales: (1) hidrófobos: alanina, isoleucina, valina, metionina y leucina; (2) hidrófilos neutros: asparagina, glutamina, cisteína, treonina y serina; (3) ácidos: ácido aspártico y ácido glutámico; (4) básicos: arginina, histidina y lisina; (5) restos que tienen influencia en la conformación de la cadena: glicina y prolina; y (6) aromáticos: tirosina, triptófano y fenilalanina. El número de aminoácidos modificados es, por ejemplo, diez, nueve, ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos o uno, pero sin limitación a esto.

60 En general, un total de seis regiones determinantes de complementariedad (CDR; regiones hipervariables) presentes en las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera interactúan para formar el sitio o los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo. Se sabe que una de estas regiones variables tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque la afinidad será menor que cuando se incluyen todos los sitios de unión. Por lo tanto, los polipéptidos en contexto con la presente invención que tienen una actividad de unión a antígeno pueden codificar porciones de fragmentos que contienen los sitios de unión a antígeno correspondientes de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo siempre que mantengan la actividad de unión a antígeno deseada.



Los métodos de la presente invención permiten la preparación eficaz de, por ejemplo, multímeros polipeptídicos deseados que realmente tienen la actividad descrita anteriormente.

- 5 En una realización preferida de la presente divulgación, los restos de aminoácidos apropiados para ser "modificados" pueden seleccionarse de, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo y las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera y la cadena ligera del anticuerpo.

#### 10 Expresión de ADN

Los ADN que codifican los polipéptidos modificados se clonan (insertan) en un vector apropiado y después se introducen en las células hospedadoras. No hay una limitación particular en los vectores siempre que porten de manera estable los ácidos nucleicos insertados. Por ejemplo, cuando se usa *E. coli* como hospedador, los vectores incluyen vectores de clonación. Los vectores de clonación preferidos incluyen vectores pBluescript (Stratagene). Es posible usar distintos vectores disponibles comercialmente. Los vectores de expresión son particularmente útiles como vectores para producir los multímeros polipeptídicos o polipéptidos en contexto con la presente invención. No existe una limitación particular en los vectores de expresión siempre que expresen polipéptidos *in vitro*, en *E. coli*, en células de cultivo o en organismos. Los vectores preferidos incluyen, por ejemplo, vectores pBEST (Promega) para expresión *in vitro*; vectores pET (Invitrogen) para expresión en *E. coli*; el vector pME18S-FL3 (número de acceso de GenBank AB009864) para la expresión en células de cultivo; y el vector pME18S (Mol. Cell. Biol. 8:466-472 (1988)) para la expresión en organismos. Los ADN se pueden insertar en vectores mediante métodos convencionales, como la reacción con ligasa, utilizando sitios de enzimas de restricción (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Sección 11.4-11.11).

25 No hay limitación particular en las células hospedadoras anteriores, y se pueden usar diferentes células hospedadoras dependiendo del fin. Las células para expresar polipéptidos incluyen, por ejemplo, células bacterianas (por ejemplo, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Streptomyces* y *Bacillus subtilis*), células fúngicas (p. ej., levadura y *Aspergillus*), células de insectos (p. ej., *Drosophila* S2 y *Spodoptera* SF9), células animales (p. ej., CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK293, Células de melanoma de Bowes) y células vegetales. Los vectores se pueden introducir en las células hospedadoras utilizando métodos conocidos, tal como el método de precipitación con fosfato de calcio, el método de electroporación (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Sección 9.1-9.9), método de lipofección y método de microinyección.

35 Para secretar polipéptidos expresados en células hospedadoras en el lumen del retículo endoplasmático, el espacio periplásmico o el entorno extracelular, se pueden incorporar señales de secreción apropiadas en los polipéptidos de interés. Estas señales pueden ser intrínsecas o extrañas a los polipéptidos de interés.

Los vectores de expresión para los polipéptidos primero, segundo, tercero y cuarto pueden construirse insertando ADN que codifican los polipéptidos individualmente en vectores separados. De manera alternativa, algunos de los ADN que codifican los polipéptidos primero, segundo, tercero y cuarto (por ejemplo, un ADN que codifica el primer polipéptido y un ADN que codifica el segundo polipéptido) pueden insertarse en un único vector para construir vectores de expresión. Cuando se construye un vector de expresión insertando múltiples ADN en un único vector, no hay limitación en la combinación de ADN que codifican el polipéptido a insertar.

#### 45 Recuperación de productos de expresión

50 Cuando los polipéptidos se secretan a un medio de cultivo, los productos de expresión se recuperan recogiendo el medio. Cuando los polipéptidos se producen en células, primero se lisan las células y después se recogen los polipéptidos.

Los polipéptidos pueden recogerse y purificarse a partir de un cultivo de células recombinantes mediante métodos conocidos que incluyen precipitación con sulfato de amonio o con etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxilapatita y cromatografía con lectina.

En la presente invención, se usa cromatografía de afinidad con proteína A.

60 Las columnas de proteína A incluyen, pero sin limitación, Hyper D (PALL), POROS (Applied Biosystems), Sepharose F. F. (GE) y ProSep (Millipore). De manera alternativa, la cromatografía de afinidad con proteína A se puede realizar usando una resina unida por un ligando que imita la capacidad de unión a IgG de la proteína A. Además, cuando se usa un mimético de proteína A, se pueden aislar y purificar multímeros polipeptídicos de interés creando una diferencia en la capacidad de unión como resultado de las modificaciones de aminoácidos en contexto con la presente invención. Tales miméticos de proteína A incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, mabSelect SuRE (GE Healthcare).

65 Asimismo, la presente invención proporciona multímeros polipeptídicos obtenidos por los métodos de producción o

purificación de la presente invención.

La presente invención también contempla multímeros polipeptídicos que comprenden el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, en donde la capacidad de unión a proteína A es diferente entre el primer y el segundo polipéptido.

Dichos multímeros polipeptídicos se pueden obtener por los métodos descritos en el presente documento. Las estructuras y propiedades de los multímeros polipeptídicos son como se describen anteriormente y se resumen a continuación.

En comparación con la modificación previa de los aminoácidos, se ha alterado la capacidad de unión a proteína A de los multímeros polipeptídicos en contexto con la presente invención. De manera más específica, la capacidad de unión a proteína A se ha alterado en uno o ambos del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno. En un multímero polipeptídico en contexto con la presente invención, la capacidad de unión a proteína A del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno es diferente de la del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno que no tiene actividad de unión a antígeno. En consecuencia, el pH del disolvente para la elución de la proteína A es diferente para el primer polipéptido y para el segundo polipéptido en la cromatografía de afinidad.

Asimismo, el primer polipéptido y/o el segundo polipéptido pueden formar un multímero con uno o dos terceros polipéptidos.

Por lo tanto, la presente invención contempla multímeros polipeptídicos que comprenden el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, y uno o dos terceros polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno, en donde la capacidad de unión a proteína A es diferente para los polipéptidos primero y segundo. Dichos multímeros polipeptídicos también se pueden obtener por los métodos descritos en el presente documento.

Los multímeros polipeptídicos pueden comprender adicionalmente un cuarto polipéptido. Uno cualquiera del primer polipéptido y el segundo polipéptido pueden formar un multímero con el tercer polipéptido, mientras que el otro puede formar otro multímero con el cuarto polipéptido.

Por lo tanto, la presente invención contempla multímeros polipeptídicos que comprenden el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, en donde la capacidad de unión a proteína A es diferente para los polipéptidos primero y segundo. Dichos multímeros polipeptídicos también se pueden obtener por los métodos descritos en el presente documento.

El primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno anteriores pueden comprender una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo o una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo. La secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo o un dominio Fc de anticuerpo incluye, pero sin limitación, una secuencia de aminoácidos de una región constante derivada de IgG humana.

Entre tanto, el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno anteriores pueden comprender una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena ligera de anticuerpo.

Asimismo, los polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno pueden comprender una secuencia de aminoácidos de una región variable de anticuerpo (por ejemplo, secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, CDR3, FR1, FR2, FR3 y FR4).

El primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno anteriores pueden comprender una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que comprende una región variable de cadena ligera de anticuerpo y una región constante de cadena pesada de anticuerpo. El tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno anteriores pueden comprender una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo, o una secuencia de aminoácidos que comprende una región variable de cadena pesada de anticuerpo y una región constante de cadena ligera de anticuerpo.

Un multímero polipeptídico en contexto con la presente invención puede ser un anticuerpo multiespecífico. Los

anticuerpos multiespecíficos en contexto con la presente invención incluyen, pero sin limitación, anticuerpos biespecíficos capaces de unirse específicamente a dos tipos de antígenos.

5 En un multímero polipeptídico en contexto con la presente divulgación, se han modificado uno o más restos de aminoácidos para que haya una diferencia (mayor) de la capacidad de unión a proteína A entre el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno. Tal como se ha descrito anteriormente, los sitios de modificación incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, los siguientes restos de aminoácidos: TLMISR en las posiciones 250-255, VLHQDWLNGK en las posiciones 308-317, EALHNY en las posiciones 430-436, preferentemente TLMIS en las posiciones 250-254, LHQD en las posiciones 309-312, LN en las posiciones 314-315, E en la posición 430, LHNHY en las posiciones 432-436, más preferentemente LMIS en las posiciones 251-254, LHQ en las posiciones 309-311, L en la posición 314, LHNH en las posiciones 432-435 y particularmente LMIS en las posiciones 252-254, L en la posición 309, Q en la posición 311 y NYH en las posiciones 434-436 (numeración EU) en un dominio Fc o en una región constante de cadena pesada de anticuerpo. Entre tanto, en cuanto a las modificaciones de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de anticuerpo, los sitios de modificación preferidos incluyen FR1, CDR2 y FR3.

20 De manera más específica, los multímeros polipeptídicos de la presente divulgación, incluyen, pero sin limitación, multímeros polipeptídicos en los que el resto de aminoácido en la posición 435 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo o región constante de cadena pesada de anticuerpo es histidina o arginina en uno cualquiera del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, mientras que el otro polipéptido tiene un resto de aminoácido diferente en la posición 435 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo o región constante de cadena pesada de anticuerpo.

25 En los métodos de la presente invención, el resto de aminoácido en la posición 435 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos del dominio Fc o la región constante de cadena pesada es histidina o arginina en el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y arginina o histidina respectivamente en el segundo polipéptido que tiene o que no tiene una actividad de unión a antígeno.

30 Asimismo, los multímeros polipeptídicos en contexto con la presente invención incluyen, pero sin limitación, multímeros polipeptídicos en los que el resto de aminoácido en la posición 435 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo es histidina en uno cualquiera del primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y del segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, mientras que el resto de aminoácido en la posición 435 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo es arginina en el otro polipéptido.

35 Asimismo, los multímeros polipeptídicos de la presente divulgación, que comprende los polipéptidos primero y segundo incluyen, pero sin limitación, los ejemplos a continuación.

40 (1) multímeros polipeptídicos que comprenden el primer o segundo polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que los restos de aminoácidos en las posiciones 435 y 436 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo derivada de una IgG humana se han modificado a histidina (His) y tirosina (Tyr), respectivamente. Dichos multímeros polipeptídicos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, multímeros polipeptídicos que comprenden el primer o segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, 11, 13 o 15.

45 (2) multímeros polipeptídicos que comprenden el primer o segundo polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que los restos de aminoácidos en las posiciones 435 y 436 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo derivada de una IgG humana se han modificado a arginina (Arg) y fenilalanina (Phe), respectivamente.

50 Dichos multímeros polipeptídicos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, multímeros polipeptídicos que comprenden el primer o segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 o 12.

55 (3) multímeros polipeptídicos que comprenden el primer o segundo polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que los restos de aminoácidos en las posiciones 435 y 436 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo derivada de una IgG humana se han modificado a arginina (Arg) y tirosina (Tyr), respectivamente. Dichos multímeros polipeptídicos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, multímeros polipeptídicos que comprenden el primer o segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

60 (4) multímeros polipeptídicos que comprenden los polipéptidos primero y segundo, en donde uno cualquiera de los polipéptidos comprende una secuencia de aminoácidos en la que los restos de aminoácidos en las posiciones 435 y 436 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo derivada de una IgG humana se han modificado a histidina (His) y tirosina (Tyr), respectivamente; y el otro polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos en la que los restos de aminoácidos en las posiciones 435 y 436 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo se han modificado a arginina (Arg) y fenilalanina (Phe), respectivamente.

65 Dichos multímeros polipeptídicos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, multímeros polipeptídicos que

comprenden el primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, 11, 13 o 15 y el segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 o 12.

(5) multímeros polipeptídicos que comprenden los polipéptidos primero y segundo, en donde uno cualquiera de los polipéptidos comprende una secuencia de aminoácidos en la que los restos de aminoácidos en las posiciones 435 y 436 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo derivada de una IgG humana se han modificado a histidina (His) y tirosina (Tyr), respectivamente; y el otro polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos en la que los restos de aminoácidos en las posiciones 435 y 436 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo se han modificado a arginina (Arg) y tirosina (Tyr), respectivamente.

Dichos multímeros polipeptídicos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, multímeros polipeptídicos que comprenden el primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, 11, 13 o 15 y el segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

(6) multímeros polipeptídicos que comprenden los polipéptidos primero y segundo, en donde uno cualquiera de los polipéptidos comprende una secuencia de aminoácidos en la que los restos de aminoácidos en las posiciones 435 y 436 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo derivada de una IgG humana se han modificado a arginina (Arg) y fenilalanina (Phe), respectivamente; y el otro polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos en la que los restos de aminoácidos en las posiciones 435 y 436 (numeración EU) en la secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo se han modificado a arginina (Arg) y tirosina (Tyr), respectivamente.

Dichos multímeros polipeptídicos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, multímeros polipeptídicos que comprenden el primer polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 o 12 y el segundo polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

Los polipéptidos primero y segundo anteriores pueden comprender adicionalmente una región variable de cadena pesada de anticuerpo. Los multímeros polipeptídicos de (1) a (6) anteriores también pueden comprender el tercer polipéptido y/o el cuarto polipéptido.

Asimismo, la presente invención contempla variantes de polipéptidos que comprenden un polipéptido que comprende una mutación en el resto de aminoácido en la posición 435 o 436 (numeración EU). Dichas variantes de polipéptidos incluyen, pero sin limitación, variantes de polipéptidos que comprenden un polipéptido descrito en los Ejemplos.

Asimismo, la presente invención contempla ácidos nucleicos que codifican un polipéptido (polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno) que constituye un multímero polipeptídico en el contexto de la presente invención. La presente invención también contempla vectores que portan tales ácidos nucleicos.

La presente invención también contempla células hospedadoras que comprenden los ácidos nucleicos o vectores anteriores. No existe limitación particular en las células hospedadoras, e incluyen, por ejemplo, *E. coli* y diferentes células vegetales y animales. Las células hospedadoras pueden usarse, por ejemplo, como un sistema de producción para producir y expresar los multímeros polipeptídicos o polipéptidos en contexto con la presente invención. Existen sistemas de producción *in vitro* e *in vivo* para producir los multímeros polipeptídicos o polipéptidos. Los sistemas de producción *in vitro* incluyen aquellos que usan células eucariotas y células procariotas.

Las células eucariotas que pueden usarse como células hospedadoras incluyen, por ejemplo, células animales, células vegetales y células fúngicas. Las células animales incluyen: células de mamíferos, por ejemplo, CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945), COS, HEK293, 3T3, mieloma, BHK (riñón de hámster recién nacido), HeLa y Vero; células de anfibios tales como ovocitos de *Xenopus laevis* (Valle, et al., Nature (1981) 291: 338-340); y células de insectos tales como Sf9, Sf21 y Tn5. Para expresar los multímeros polipeptídicos o polipéptidos en contexto con la presente invención, se pueden usar de forma adecuada CHO-DG44, CHO-DX11B, células COS7, células HEK293 y células BHK. De las células animales, las células CHO son particularmente preferentes para la expresión a gran escala. Los vectores pueden introducirse en una célula hospedadora mediante, por ejemplo, métodos con fosfato de calcio, métodos DEAE-dextrano, métodos que usan liposoma catiónico DOTAP (Boehringer-Mannheim), métodos de electroporación o métodos de lipofección.

Se sabe que las células vegetales tales como las células derivadas de *Nicotiana tabacum* y las células de *Lemna minor* son sistemas de producción de proteínas, y estas células pueden usarse para producir multímeros polipeptídicos o polipéptidos en contexto con la presente invención mediante métodos que cultivan callos de estas células. Los sistemas de expresión de proteínas que usan células fúngicas, incluidas las células de levaduras, por ejemplo, las células del género *Saccharomyces* (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, etc.) y las células de hongos filamentosos, por ejemplo, el género *Aspergillus* (*Aspergillus niger*, etc.) son conocidas, y estas células pueden usarse como un hospedador para producir multímeros polipeptídicos o polipéptidos en contexto con la presente invención.

Cuando se usan células procariotas, están disponibles los sistemas de producción que usan células bacterianas. Se conocen sistemas de producción que usan células bacterianas que incluyen *Bacillus subtilis* así como *E. coli* descritas anteriormente, y pueden usarse para producir multímeros polipeptídicos o polipéptidos en contexto con la presente invención.

5 Cuando se produce un multímero polipeptídico o polipéptido usando una célula hospedadora contemplada en la presente invención, un polinucleótido que codifica el multímero polipeptídico o polipéptido en contexto con la presente invención puede expresarse cultivando la célula hospedadora transformada con un vector de expresión que comprende el polinucleótido. El cultivo se puede realizar de acuerdo con métodos conocidos. Por ejemplo, cuando se usan células animales como células hospedadoras, se puede usar DMEM, MEM, RPMI 1640, o IMDM como el medio de cultivo. El medio de cultivo puede usarse con soluciones con complementos de suero tales como FBS o suero de ternera fetal (FCS). De manera alternativa, las células pueden cultivarse en cultivos sin suero. El pH preferido es de aproximadamente 6 a 8 durante el curso del cultivo. La incubación se lleva a cabo generalmente a aproximadamente 30 a 40 ° C durante aproximadamente 15 a 200 horas. El medio se intercambia, airea o agita, según sea necesario.

10 Por otro lado, los sistemas para producir polipéptidos *in vivo* incluyen, por ejemplo, aquellos que usan animales y aquellos que usan plantas. Se introduce un polinucleótido de interés en un animal o planta para producir el polipéptido en el cuerpo del animal o la planta, y después se recoge el polipéptido. El "hospedador" contemplado en la presente invención incluye tales animales y plantas.

15 Cuando se usan animales, están disponibles los sistemas de producción que usan mamíferos o insectos. Se pueden utilizar mamíferos tales como cabras, cerdos, ovejas, ratones y vacas (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications (1993)). Cuando se usan mamíferos, se pueden usar animales transgénicos.

20 Por ejemplo, un polinucleótido que codifica un multímero polipeptídico o polipéptido en contexto con la presente invención puede prepararse como un gen de fusión con un gen que codifica un polipéptido producido específicamente en la leche, tal como la  $\beta$ -caseína de cabra. A continuación, los fragmentos de polinucleótidos que contienen este gen de fusión se inyectan en embriones de cabra, que después se introducen nuevamente en cabras hembras. El anticuerpo de interés puede obtenerse de la leche producida por las cabras transgénicas, que nacen de las cabras que recibieron los embriones, o por sus crías. Se pueden administrar hormonas apropiadas a las cabras transgénicas para aumentar el volumen de leche que contiene el anticuerpo producido por las cabras transgénicas (Ebert et al., Bio/Technology (1994) 12: 699-702).

25 Se pueden usar insectos tales como gusanos de seda para producir multímeros polipeptídicos o polipéptidos en contexto con la presente invención. Cuando se usan gusanos de seda, los baculovirus que portan un polinucleótido que codifica un multímero polipeptídico o polipéptido de interés pueden usarse para infectar gusanos de seda, de modo que el multímero polipeptídico o polipéptido de interés pueda obtenerse de los fluidos corporales de estos gusanos de seda (Susumu et al., Nature (1985) 315:592-594).

30 Las plantas usadas para producir multímeros polipeptídicos o polipéptidos en contexto con la presente invención incluyen, por ejemplo, tabaco. Cuando se usa tabaco, se inserta un polinucleótido que codifica un multímero polipeptídico o polipéptido de interés en un vector de expresión vegetal, por ejemplo, por ejemplo, pMON 530, y después el vector se introduce en una bacteria tal como *Agrobacterium tumefaciens*. Después, las bacterias se usan para infectar tabaco, tal como *Nicotiana tabacum*, y el multímero polipeptídico o polipéptido deseado se puede obtener de las hojas del tabaco (Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24: 131-138). De manera alternativa, se puede usar la misma bacteria para infectar a *Lemna minor*, y después de la clonación, se puede obtener el multímero polipeptídico o polipéptido deseado de las células de *Lemna minor* (Cox K.M. et al., Nat. Biotechnol. Dic de 2006; 24(12):1591-1597).

35 El multímero polipeptídico o polipéptido así obtenido puede aislarse del interior o del exterior (tal como el medio y la leche) de las células hospedadoras, y purificarse como un multímero polipeptídico o polipéptido sustancialmente puro y homogéneo. Los métodos utilizados para separar y purificar un polipéptido multímero o polipéptido no están limitados, y se pueden aplicar métodos utilizados en la purificación convencional de polipéptidos. Los anticuerpos pueden aislarse y purificarse seleccionando una combinación apropiada de, por ejemplo, columnas cromatográficas, filtración, ultrafiltración, precipitación de proteínas por adición de sal, precipitación con disolvente, extracción con disolvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, isoelectroenfoque, diálisis, recristalización y similares.

40 Las cromatografías incluyen, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, cromatografía de fase inversa y cromatografía de adsorción (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., (1996) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Estas cromatografías pueden llevarse a cabo utilizando cromatografía en fase líquida como HPLC y FPLC. Ejemplos de columnas para cromatografía de afinidad incluyen columnas de proteína A y columnas de proteína G. Ejemplos de las columnas que usan proteína A incluyen, pero sin limitación, Hyper D, POROS y Sepharose F. F. (Farmacia).

45 Según sea necesario, se pueden añadir modificaciones y los péptidos se pueden eliminar a partir de un multímero polipeptídico o polipéptido arbitrariamente mediante tratamiento con una enzima de modificación de proteínas apropiada antes o después de la purificación del multímero polipeptídico o polipéptido. Dichas enzimas de modificación de proteínas incluyen, por ejemplo, tripsina, quimiotripsina, lisil endopeptidasa, proteína cinasa y glucosidasa.

Otra realización preferida de la presente invención incluye un método correspondiente para producir un multímero polipeptídico o polipéptido de la presente invención, que comprende las etapas de cultivar las células hospedadoras de la presente invención como se describe anteriormente y recoger el polipéptido del cultivo celular.

5 Asimismo, la presente divulgación contempla composiciones farmacéuticas (agentes) que comprenden un multímero polipeptídico o polipéptido de la presente divulgación y un transportador farmacéuticamente aceptable. En el presente documento, "composiciones farmacéuticas" generalmente se refiere a agentes para tratar o prevenir, o probar y diagnosticar enfermedades.

10 Las composiciones farmacéuticas contempladas en la presente divulgación pueden formularse mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, tales composiciones farmacéuticas pueden usarse por vía parenteral en forma de inyecciones, que son soluciones o suspensiones estériles preparadas con agua u otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, tales composiciones se pueden formular combinando apropiadamente con un transportador o medio farmacéuticamente aceptable, de manera específica, agua estéril, solución salina fisiológica, 15 aceite vegetal, emulsionante, suspensión, tensioactivo, estabilizante, agente aromatizante, excipiente, vehículo, conservante, aglutinante o similares y mezclado en una forma de dosis unitaria que cumple los requisitos generalmente aceptados para la preparación de productos farmacéuticos. En tales preparaciones, la cantidad de principio activo se ajusta de modo que se obtenga una cantidad adecuada dentro de un intervalo especificado.

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

25 Las soluciones acuosas para inyección incluyen, por ejemplo, soluciones salinas fisiológicas e isotónicas que contienen glucosa u otros adyuvantes (por ejemplo, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro sódico). Pueden usarse en combinación solubilizantes apropiados, por ejemplo, alcoholes (etanol y similares), polialcoholes (propilenglicol, polietilenglicol y similares), tensioactivos no iónicos (polisorbato 80™, HCO-50 y similares).

30 Los aceites incluyen aceites de sésamo y soja. El benzoato de bencilo y/o el alcohol bencílico se pueden usar en combinación como solubilizantes. También se pueden combinar tampones (por ejemplo, el tampón fosfato y el tampón acetato de sodio), agentes suavizantes (por ejemplo, clorhidrato de procaína), estabilizantes (por ejemplo, alcohol bencílico y fenol) y/o antioxidantes. Las inyecciones preparadas generalmente se introducen en ampollas apropiadas.

35 Las composiciones farmacéuticas contempladas en la presente divulgación se administran preferentemente por vía parenteral. Por ejemplo, las composiciones pueden estar en forma de inyecciones, agentes transnasales, agentes transpulmonares o agentes transdérmicos. Por ejemplo, tales composiciones pueden administrarse sistémicamente o localmente mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, o similares.

40 Los métodos de administración pueden seleccionarse de manera apropiada teniendo en cuenta la edad y los síntomas del paciente. La dosificación de una composición farmacéutica que comprende un multímero polipeptídico o polipéptido o un polinucleótido que codifica un multímero polipeptídico o polipéptido puede establecerse, por ejemplo, dentro del intervalo de 0,0001 a 1000 mg/kg de peso para cada administración. De manera alternativa, la dosis puede ser, por ejemplo, de 0,001 a 100.000 mg por paciente. Sin embargo, en el presente documento, la dosificación no se limita necesariamente a los intervalos descritos anteriormente. Aunque el método de dosificación y de administración varían 45 según el peso, la edad, los síntomas y similares del paciente, los expertos en la materia pueden seleccionar métodos de dosificación y de administración apropiados en consideración de estos factores.

50 Los anticuerpos multiespecíficos en contexto con la presente invención pueden formularse combinándolos con otros componentes farmacéuticos según sea necesario.

### Ejemplos

55 A continuación, en el presente documento, la presente invención se describirá de manera específica haciendo referencia a los Ejemplos, pero no debe interpretarse como limitada a los mismos.

[Ejemplo 1] Construcción de vectores de expresión para genes de anticuerpos y expresión de los anticuerpos correspondientes

60 Las regiones variables de cadena H de anticuerpo utilizadas fueron: Q153 (la región variable de cadena H de un anticuerpo anti-F.IX humano, SEQ ID NO: 1), Q407 (la región variable de cadena H de un anticuerpo anti-F.IX humano, SEQ ID NO: 2), J142 (la región variable de cadena H de un anticuerpo anti-F.X humano, SEQ ID NO: 3), J300 (la región variable de cadena H de un anticuerpo anti-F.X humano, SEQ ID NO: 4), y MRA-VH (la región variable de cadena H de un anticuerpo anti-receptor de interleucina-6 humano, SEQ ID NO: 5).

65 Las regiones variables de cadena L de anticuerpo utilizadas fueron:

L180-k (una cadena L común a un anticuerpo anti-F.IX humano y a un anticuerpo anti-F.X humano, SEQ ID NO: 6), L210-k (una cadena L común a un anticuerpo anti-F.IX humano/anticuerpo anti-F.X humano, SEQ ID NO: 7), y MRA-k (la cadena L de un anticuerpo anti-receptor de interleucina-6 humano, SEQ ID NO: 8).

5 Las regiones constantes de cadena H de anticuerpo utilizadas fueron:  
 G4d (SEQ ID NO: 9), que se construyó a partir de IgG4 mediante la introducción de una mutación por sustitución de Pro por Ser en la posición 228 (numeración EU) y eliminando la Gly y Lys C-terminales; z72 (SEQ ID NO: 10), que se construyó a partir de G4d mediante la introducción de las siguientes mutaciones: una mutación por sustitución de Arg por His en la posición 435 (numeración EU); una mutación por sustitución de Phe por Tyr en la posición 436 (numeración EU); y una mutación por sustitución de Pro por Leu en la posición 445 (numeración EU); z7 (SEQ ID NO: 11), que se construyó a partir de G4d mediante la introducción de una mutación por sustitución de Lys por Glu en la posición 356 (numeración EU); z73 (SEQ ID NO: 12), que se construyó a partir de Gz72 mediante la introducción de una mutación por sustitución de Glu por Lys en la posición 439 (numeración EU); z106 (SEQ ID NO: 13), que se construyó a partir de z7 mediante la introducción de las siguientes mutaciones: una mutación por sustitución de Gln por Lys en la posición 196 (numeración EU); una mutación por sustitución de Tyr por Phe en la posición 296 (numeración EU); y una mutación por sustitución de Lys por Arg en la posición 409 (numeración EU); z107 (SEQ ID NO: 14), que se construyó a partir de z73 mediante la introducción de las siguientes mutaciones: una mutación por sustitución de Gln por Lys en la posición 196 (numeración EU); una mutación por sustitución de Tyr por Phe en la posición 296 (numeración EU); una mutación por sustitución de Lys por Arg en la posición 409 (numeración EU); y una mutación por sustitución de Tyr por Phe en la posición 436 (numeración EU); y G1d (SEQ ID NO: 15), que se construyó eliminando la Gly y Lys de IgG1 C-terminales. Se introdujeron mutaciones por sustitución de Lys por Glu en la posición 356 (numeración EU) y Glu por Lys en la posición 439 (numeración EU) para la formación eficaz de moléculas heteroméricas a partir de las cadenas H correspondientes en la producción de anticuerpos heteroméricos ((documento WO 2006/106905) PROCESS FOR PRODUCTION OF POLYPEPTIDE BY REGULATION OF ASSEMBLY).

Los genes Q153-G4d y Q153-z7 de la cadena H del anticuerpo anti-F.IX humano se construyeron uniendo respectivamente G4d y z7 cadena abajo de Q153. El gen Q407-z106 de la cadena H del anticuerpo anti-F.IX humano se construyó uniendo z106 cadena abajo de Q407. Los genes J142-G4d, J142-z72 y J142-z73 de la cadena H del anticuerpo anti-F.X humano, se construyeron uniendo respectivamente G4d, z72 y z73 cadena abajo de J142. El gen J300-z107 de la cadena H del anticuerpo anti-F.X humano se construyó uniendo z107 cadena abajo de J300. Los genes MRA-G1d, MRA-z106 y MRA-z107 de la cadena H del anticuerpo anti-receptor de interleucina-6 humano se construyeron uniendo respectivamente G1d, z106 y z107 cadena abajo de MRA-VH.

35 Los genes de los anticuerpos correspondientes (Q153-G4d, Q153-z7, Q407-z106, J142-G4d, J142-z72, J142-z73, J300-z106, MRA-G1d, MRA-z106, MRA-z107, L180-k, L210-k y MRA-k) se insertaron en vectores de expresión de células animales.

Los siguientes anticuerpos se expresaron transitoriamente en células FreeStyle293 (Invitrogen) mediante transfección usando los vectores de expresión construidos. Como se muestra a continuación, los anticuerpos se nombraron usando las combinaciones de genes de anticuerpos transfectados.

MRA-G1d/MRA-k  
 MRA-z106/MRA-z107/MRA-k  
 Q153-G4d/J142-G4d/I180-k  
 45 Q153-G4d/J142-z72/I180-k  
 Q153-z7/J142-z73/I180-k  
 Q407-z106/J300-z107/I210-k

[Ejemplo 2] Evaluación de las condiciones de elución para cromatografía de afinidad con proteína A

50 Q153-G4d/J142-G4d/I180-k y Q153-G4d/J142-z72/I180-k se expresaron de forma transitoria, y el medio del cultivo de células FreeStyle293 resultante (en adelante en el presente documento abreviado como CM) se usó como muestra para evaluar las condiciones de elución para cromatografía de afinidad con proteína A. Las muestras de CM se filtraron a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 µm, y se cargaron en una columna rProtein A Sepharose de Flujo Rápido (GE Healthcare) equilibrada con D-PBS. La columna se sometió a lavados 1 y 2 y a eluciones de 1 a 5 de manera gradual como se muestra en la Tabla 1. El volumen de CM a cargar en la columna se ajustó a 20 mg de anticuerpo/ml de resina. Se recogieron las fracciones eluidas en cada condición, y las fracciones eluidas correspondientes se analizaron por cromatografía de intercambio catiónico para identificar sus componentes. Para preparar los controles, cada CM se cargó en resina rProtein G Sepharose de flujo Rápido (GE Healthcare). Las muestras purificadas por elución de forma discontinua se usaron como controles. Debido a que la proteína G se une al dominio Fab de un anticuerpo, todas las especies de anticuerpos (un anticuerpo bispecifico de interés en el que dos tipos de cadenas H están asociadas de manera heteromérica (anticuerpo heteromérico) y como impureza, los anticuerpos homoméricos monoespecíficos en los que las cadenas H de tipo sencillo están asociadas homoméricamente) en CM pueden purificarse utilizando proteína G, independientemente de su afinidad de unión a proteína A.

[Tabla 1]

Equilibrado	D-PBS
Lavado 1	Arg-HCl/ D-PBS 400 mM
Lavado 2	Citrato de sodio 20 mM, pH 5,0
Elución 1	Citrato de sodio 20 mM, pH 4,0
Elución 2	Citrato de sodio 20 mM, pH 3,8
Elución 3	Citrato de sodio 20 mM, pH 3,6
Elución 4	Citrato de sodio 20 mM, pH 3,4
Elución 5	Citrato de sodio 20 mM, pH 3,2

El CM en el que se habían expresado Q153-G4d/J142-G4d/I180-k o Q153-G4d/J142-z72/I180-k se eluyó de una columna de proteína A (elución 1 a 5), y se analizaron las fracciones eluidas correspondientes por cromatografía de intercambio catiónico. En cuanto a Q153-G4d/J142-G4d/I180-k, el análisis reveló que a medida que la condición de elución se modificó de 1 a 5, es decir, a medida que se redujo el pH del tampón de elución, la composición de anticuerpos de las fracciones eluidas cambió gradualmente en el orden del anticuerpo homomérico J142-G4d/I180-k al anticuerpo heteromérico.

Q153-G4d/J142-G4d/I180-k, y después al anticuerpo homomérico Q153-G4d/I180-k. Se entiende que el orden de elución está de acuerdo con la capacidad de unión para la proteína A. Esto implica que el anticuerpo homomérico Q153-G4d/I180-k, que permaneció unido hasta que estuvo expuesto a un pH bajo, tiene una mayor capacidad de unión para la proteína A que la especie homomérica J142-G4d/I180-k (un anticuerpo homomérico contra FX) eluida a un pH alto. Se sabe que la región variable J142 es una secuencia incapaz de unirse a la proteína A. De manera específica, la especie homomérica J142-G4d/I180-k (un anticuerpo homomérico contra FX) tiene dos sitios de unión a proteína A; el anticuerpo heteromérico Q153-G4d/J142-G4d/I180-k tiene tres; y el anticuerpo homomérico Q153-G4d/I180-k (anticuerpo homomérico contra FX) tiene cuatro sitios de unión a proteína A. Por lo tanto, se reveló que más sitios de unión a proteína A dieron como resultado una unión más fuerte a la proteína A y, por lo tanto, se necesitó un pH más bajo para la elución.

Entre tanto, en cuanto a Q153-G4d/J142-z72/I180-k, se reveló que a medida que la condición de elución se alteró de 1 a 5, la composición del anticuerpo en la fracción eluida cambió del anticuerpo heteromérico Q153-G4d/J142-z72/I180-k al anticuerpo homomérico Q153-G4d/I180-k. El anticuerpo homomérico J142-z72/I180-k (un anticuerpo homomérico contra FX) era casi indetectable en cualquier fracción eluida. Esto sugiere que J142-z72/I180-k no tiene capacidad de unión a proteína A. Se cree que la falta de capacidad de unión a proteína A de J142-z72 podría deberse a la mutación por sustitución introducida de Arg por His en la posición 435 (numeración EU). El anticuerpo homomérico J142-z72/I180-k (un anticuerpo homomérico contra FX) no tiene sitio de unión a proteína A, mientras que el anticuerpo heteromérico Q153-G4d/J142-z72/I180-k tiene dos sitios de unión a proteína A y el anticuerpo homomérico Q153-G4d/I180-k (un anticuerpo homomérico contra FIX) tiene cuatro. El anticuerpo homomérico J142-z72/I180-k (un anticuerpo homomérico contra FX) pasa a través de la columna porque no se une a la proteína A. Esta es la razón por la cual J142-z72/I180-k era indetectable en las fracciones eluidas. Asimismo, en ambos casos de Q153-G4d/J142-G4d/I180-k y Q153-G4d/J142-z72/I180-k, se sugirió que el anticuerpo heteromérico y el anticuerpo homomérico Q153-G4d/I180-k (un anticuerpo homomérico contra FIX) fueron separables entre sí a pH 3,6 o a un pH más bajo.

[Ejemplo 3] Aislamiento y purificación de anticuerpos heteroméricos por cromatografía con proteína A

Se usaron muestras de CM que contenían los siguientes anticuerpos:

Q153-G4d/J142-G4d/I180-k  
 Q153-G4d/J142-z72/I180-k  
 Q153-z7/J142-z73/I180-k  
 Q407-z106/J300-z107/I210-k

Las muestras de CM se filtraron a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , y se cargaron en una columna rProtein A Sepharose de Flujo Rápido (GE Healthcare) equilibrada con D-PBS. La columna se sometió a lavados 1 y 2 y a las eluciones 1 y 2 como se muestra en la Tabla 2 (excepto que Q407-z106/J300-z107/I210-k se sometió a la elución 1 solamente). Las condiciones de elución se determinaron basándose en el resultado descrito en el Ejemplo 2. El volumen de CM a cargar en la columna se ajustó a 20 mg de anticuerpo/ml de resina. Se recogieron fracciones correspondientes eluidas en cada condición y se analizaron mediante cromatografía de intercambio catiónico para identificar sus componentes. Para preparar los controles, cada CM se cargó en la resina rProtein G Sepharose de Flujo Rápido (GE Healthcare) de la misma manera que se describe en el Ejemplo 2. Las muestras purificadas por elución de forma discontinua se usaron como controles.



[Tabla 2]

Equilibrado	D-PBS
Lavado 1	Arg-HCl/ D-PBS 400 mM
Lavado 2	Citrato de sodio 20 mM, pH 5,0
Elución 1	Citrato de sodio 20 mM, pH 3,6
Elución 2	Citrato de sodio 20 mM, pH 2,7

5 El resultado del análisis de cromatografía de intercambio catiónico para cada fracción eluida se muestra en la Tabla 3 a continuación. Los valores representan el área del pico de elución expresada en porcentaje. Excepto para el anticuerpo Q153-G4d/J142-G4d/I180-k, los anticuerpos homoméricos contra FX eran casi indetectables en cualquier fracción eluida. Por lo tanto, se reveló que no solo el anticuerpo homomérico J142-z72 (un anticuerpo homomérico contra FX) descrito en el Ejemplo 2 sino también los anticuerpos homoméricos J142-z73 y J300-z107 (un anticuerpo homomérico contra FX) eran incapaces de unirse a la proteína A. Se cree que la falta de capacidad de unión a proteína A en el anticuerpo homomérico contra FX se debió a la mutación por sustitución de Arg por His en la posición 435 (numeración EU), que se introdujo en la región constante de la cadena H del anticuerpo contra FX. El anticuerpo heteromérico, que es un anticuerpo biespecífico de interés, se detectó principalmente en la fracción de elución 1. Entre tanto, la mayoría de los anticuerpos homoméricos contra FIX se eluyeron mediante la elución 2, aunque también se detectaron a un nivel muy bajo en la fracción de elución 1. En comparación con Q153-G4d/J142-z72/I180-k, en los casos de Q153-z7/J142-z73/I180-k y Q407-z106/J300-z107/I210-k, la proporción del anticuerpo heteromérico (anticuerpo biespecífico de interés) aumentó considerablemente en la fracción eluida a pH 3,6. Por lo tanto, se demostró que, cuando se introdujeron las mutaciones por sustitución de Lys por Glu en la posición 356 (numeración EU) y de Glu por Lys en la posición 439 (numeración EU) para la formación eficaz de moléculas heteroméricas a partir de las cadenas H correspondientes en combinación con la mutación por sustitución de Arg por His en la posición 435 (numeración EU), el anticuerpo heteromérico (anticuerpo biespecífico de interés) podría purificarse a una pureza del 98 % o mayor a través de la etapa de purificación basada en proteína A sola.

25 Tal como se ha descrito anteriormente, los presentes inventores revelaron que, basándose en las diferencias en el número de sitios de unión a proteína A entre el anticuerpo heteromérico y los anticuerpos homoméricos, el anticuerpo heteromérico podría aislarse y purificarse a alta pureza a través de la etapa de cromatografía con proteína A sola.

[Tabla 3]

Q153-G4d/J142-G4d/I180-k			
Área de pico (%)	Control	Fracción eluida a pH 3,6	Fracción eluida a pH 2,7
J142-G4d/I180-k	17,6	27,5	-
Q153-G4d/J142-G4d/I180-k	48,3	58,4	9,0
Q153-G4d/I180-k	34,1	14,1	91,0

[Tabla 4]

Q153-G4d/J142-z72/I180-k			
Área de pico (%)	Control	Fracción eluida a pH 3,6	Fracción eluida a pH 2,7
J142-z72/I180-k	8,4	0,9	-
Q153-G4d/J142-z72/I180-k	50,8	81,0	2,2
Q153-G4d/I180-k	40,8	18,1	97,8

30

[Tabla 5]

Q153-z7/J142-z73/I180-k			
Área de pico (%)	Control	Fracción eluida a pH 3,6	Fracción eluida a pH 2,7
J142-z73/I180-k	3,2	-	-
Q153-z7/J142-z73/I180-k	90,7	98,1	2,7
Q153-z7/I180-k	6,1	1,9	97,3

[Tabla 6]

Q407-z106/J300-z107/I210-k			
Área de pico (%)	Control	Fracción eluida a pH 3,6	Fracción eluida a pH 2,7
J300-z107/I210-k	5,8	-	
Q407-z106/J300-z107/I210-k	84,6	98,9	
Q407-z106/I210-k	9,7	1,1	

[Ejemplo 4] Evaluación de la farmacocinética en ratones transgénicos con FcRn humano

5 Como se describe en el Ejemplo 3 anterior, los presentes inventores demostraron que al usar z106 (SEQ ID NO: 13) y z107 (SEQ ID NO: 14) para las regiones constantes de cadena H correspondientes del anticuerpo biespecífico, el anticuerpo heteromérico (anticuerpo biespecífico de interés) podría purificarse a una pureza del 98 % o mayor a través de la etapa de proteína A sola. Entre tanto, la pérdida de la afinidad de unión a proteína A probablemente da como resultado la pérdida de la actividad de unión a FcRn humano porque la proteína A y el FcRn humano reconocen el mismo sitio en un anticuerpo IgG (J Immunol. 2000, 164(10):5313-8). Actualmente, hay un método indicado para purificar un anticuerpo biespecífico a una pureza del 95 % usando la proteína A. El método usa una cadena H de IgG2b de rata que no se une a la proteína A. Catumaxomab (un anticuerpo biespecífico) purificado por este método tiene una semivida de aproximadamente 2,1 días en seres humanos. Su semivida es significativamente más corta que la semivida de una IgG1 humana normal, que es de 2 a 3 semanas (Documento no de Patente 2). En este contexto, se evaluaron los anticuerpos que tienen z106 (SEQ ID NO: 13) y z107 (SEQ ID NO: 14) descritos en el Ejemplo 3 como regiones constantes para determinar su farmacocinética.

En un experimento farmacocinético para calcular la semivida en seres humanos, la farmacocinética en ratones transgénicos con FcRn humano (ratones B6.mFcRn -/-, HFcRn Tg línea 276+/, Jackson Laboratories) se evaluó mediante el siguiente procedimiento. se administraron MRA-Gld/MRA-k (de ahora en adelante en el presente documento, abreviado como MRA-IgG1) que tiene la región constante de IgG1 y MRA-z106/MRA-z107/MRA-k (de ahora en adelante en el presente documento, abreviado como MRA-z106/z107) que tiene z106/z107 como región constante, cada uno, por vía intravenosa a los ratones una vez a una dosis de 1 mg/kg y se recogió sangre en los puntos de tiempo apropiados. La sangre recogida se centrifugó inmediatamente a 15.000 rpm y 4°C durante 15 minutos para obtener plasma sanguíneo. El plasma separado se almacenó en un congelador a -20°C o menos hasta su uso. La concentración en plasma se determinó por ELISA.

Se evaluaron MRA-IgG1 y MRA-z106/z107k para determinar su retención en plasma en ratones transgénicos con FcRn humano. Como se muestra en la Fig. 1, el resultado indica que la retención de MRA-z106/z107 en plasma fue comparable a o más duradera que la de MRA-IgG1. Tal como se ha descrito anteriormente, se demostró que z106/z107, una región constante que permite la producción o purificación eficaz del anticuerpo heteromérico a alta pureza mediante la etapa de purificación basada en proteína A sola, es comparable o superior a la IgG1 humana en términos de retención en plasma.

[Ejemplo 5] Construcción de vectores de expresión para genes de anticuerpos y expresión de los anticuerpos correspondientes

Las regiones variables de cadena H de anticuerpo utilizadas fueron:

40 Q499 (la región variable de cadena H de un anticuerpo anti-F.IX humano, SEQ ID NO: 16).  
J339 (la región variable de cadena H de un anticuerpo anti-F.X humano, SEQ ID NO: 17).

La cadena L del anticuerpo usada fue:

45 L377-k (la cadena L común a un anticuerpo anti-F.IX humano y a un anticuerpo anti-F.X humano, SEQ ID NO: 18).

Las regiones constantes de cadena H de anticuerpo utilizadas fueron:

z118 (SEQ ID NO: 19), que se construyó a partir de z106 descrito en el Ejemplo 1, introduciendo una mutación por sustitución de Phe por Leu en la posición 405 (numeración EU);  
50 z121 (SEQ ID NO: 20), que se construyó a partir de z118 introduciendo una mutación por sustitución de Arg por His en la posición 435 (numeración EU); y  
z119 (SEQ ID NO: 21), que se construyó a partir de z118 introduciendo mutaciones por sustitución de Glu por Lys en la posición 356 (numeración EU) y en la posición 439 (numeración EU).

55 Los genes Q499-z118 y Q499-z121 de la cadena H del anticuerpo anti-F.IX humano se construyeron uniendo respectivamente z118 y z121 cadena abajo de Q499. El gen J339-z119 de la cadena H del anticuerpo anti-F.X humano se construyó uniendo z119 cadena abajo de J339.

Cada uno de los genes de anticuerpos (Q499-z118, Q499-z121, J339-z119 y L377-k) se insertó en un vector de expresión de células animales.

5 Los siguientes anticuerpos se expresaron transitoriamente en células FreeStyle293 (Invitrogen) mediante transfección usando los vectores de expresión construidos. Como se muestra a continuación, los anticuerpos se nombraron usando las combinaciones de genes de anticuerpos transfectados.

Q499-z118/J339-z119/l377-k

Q499-z121/J339-z119/l377-k

10 Los dos anticuerpos anteriores solo son diferentes en el aminoácido de la posición 435 en el sistema de numeración EU en la cadena H del anticuerpo anti-F.IX humano. z118 tiene His en la posición 435 y tiene afinidad de unión a proteína A. Entre tanto, z121 tiene Arg en la posición 435, y se predice que no tendrá actividad de unión a proteína A basándose en el hallazgo descrito en el Ejemplo 2. Se predice que Q499 se une a la proteína A basándose en su secuencia. Por lo tanto, en cuanto a Q499-z118/J339-z119/l377-k, la especie homomérica J339-z119/l377-k (un anticuerpo homomérico contra FX) tiene dos sitios de unión a proteína A; el anticuerpo heteromérico Q499-z118/J339-z119/l377-k tiene tres; y el anticuerpo homomérico Q499-z118/l377-k (anticuerpo homomérico contra FIX) tiene cuatro sitios de unión a proteína A. Entre tanto, en cuanto a Q499-z121/J339-z119/l377-k introducido con una modificación que conduce a la pérdida de la afinidad de unión a proteína A, la especie homomérica J339-z119/l377-k tiene dos sitios de unión a proteína A; el anticuerpo heteromérico Q499-z121/J339-z119/l377-k tiene dos; y el anticuerpo homomérico Q499-z121/l377-k tiene dos. De manera específica, incluso si se introdujera una modificación que conduce a la pérdida de la afinidad de unión a proteína A (por ejemplo, una modificación que sustituye a Arg por el aminoácido en la posición 435, numeración EU) solamente en la cadena H que se une a la proteína A a través de su región variable, no produciría el efecto que permite el aislamiento/purificación eficaz del anticuerpo heteromérico a alta pureza por la etapa de purificación basada en proteína A sola. Sin embargo, la modificación que conduce a la pérdida de la capacidad de unión a proteína A puede producir el efecto cuando se utiliza MabSelect SuRe (GE Healthcare). MabSelect SuRe es una proteína A modificada incapaz de unirse a Q499 y un transportador cromatográfico para su uso en la purificación de anticuerpos. El transportador se desarrolló para cumplir con los requisitos industriales. El ligando es una proteína A recombinante que se ha modificado por ingeniería genética para ser resistente a condiciones alcalinas. La gran estabilidad del pH permite un lavado con NaOH eficaz y de bajo coste.

Asimismo, el transportador es característico porque no se une a la región variable de cadena pesada de la subclase VH3, tal como Q499. Con respecto a Q499-z118/J339-z119/l377-k, la especie homomérica J339-z119/l377-k tiene dos sitios de unión a MabSelect SuRe; el anticuerpo heteromérico Q499-z118/J339-z119/l377-k tiene dos; y el anticuerpo homomérico Q499-z118/l377-k tiene dos. Entre tanto, en cuanto a Q499-z121/J339-z119/l377-k, la especie homomérica J339-z119/l377-k tiene dos sitios de unión a MabSelect SuRe; el anticuerpo heteromérico Q499-z121/J339-z119/l377-k tiene un único sitio; y el anticuerpo homomérico Q499-z121/l377-k no tienen ningún sitio de unión a MabSelect SuRe. De manera específica, se entiende que al combinar una proteína A modificada incapaz de unirse a la región variable del anticuerpo, tal como MabSelect SuRe, con una modificación que conduce a la pérdida de la afinidad de unión a proteína A, el anticuerpo heteromérico puede aislarse y purificarse eficazmente a alta pureza mediante la etapa de purificación basada en la proteína A sola, independientemente de la actividad de unión a proteína A de la región variable de cadena pesada.

[Ejemplo 6] Aislamiento y purificación de anticuerpos heteroméricos por cromatografía de afinidad usando proteína A modificada

El CM en el que se habían expresado Q499-z118/J339-z119/l377-k o Q499-z121/J339-z119/l377-k se sometió a cromatografía usando proteína A modificada. Las muestras de CM se filtraron a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 µm, y se cargaron en una columna Mab Select SuRe (GE Healthcare) equilibrada con D-PBS. La columna se sometió a lavados 1 y 2 y elución como se muestra en la Tabla 7. La proteína A recombinante consta de cinco dominios (A a E) que tienen actividad de unión a IgG. En Mab Select SuRe, el dominio B se ha modificado por ingeniería genética para tener una estructura tetramérica. Mab Select SuRe carece de afinidad por la región variable del anticuerpo, y es ventajoso porque permite la elución del anticuerpo incluso en condiciones más suaves en comparación con la proteína A recombinante convencional. Además, la resina tiene una resistencia alcalina mejorada y permite la limpieza en el lugar usando NaOH 0,1 a 0,5 M, y por lo tanto es más adecuado para la producción. En el experimento descrito en este Ejemplo, como se muestra en la Tabla 7, se usó ácido acético 50 mM (el pH no se ajustó y el pH medido fue de alrededor de 3,0) para la elución en lugar de la elución gradual a pH 3,6 y pH 2,7 descrita en el Ejemplo 3. Las fracciones correspondientes eluidas se recogieron y analizaron por cromatografía de intercambio catiónico para identificar sus componentes. Para preparar los controles, cada CM se cargó en la resina rProtein G Sepharose de Flujo Rápido (GE Healthcare) de la misma manera que se describe en el Ejemplo 2. Las muestras purificadas por elución de forma discontinua se usaron como controles.

A continuación, las fracciones eluidas de la proteína A se sometieron a cromatografía de intercambio iónico. Se equilibró una columna de alto rendimiento SP Sepharose (GE Healthcare) con un tampón de equilibrio (tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 6,0). Después, las fracciones eluidas de la proteína A se neutralizaron con Tris-HCl 1,5 M, (pH 7,4), se diluyeron tres veces con tampón de equilibrio y se cargaron. Los anticuerpos unidos a la columna se

eluyeron con 25 volúmenes de columna (VC) de un gradiente de concentración de NaCl de 50 a 350 mM. Las fracciones eluidas que contenían el anticuerpo heteromérico se purificaron por cromatografía de filtración en gel usando superdex200. Las fracciones de monómeros resultantes se recogieron y se usaron en la evaluación de la farmacocinética en ratones transgénicos con FcRn humano descritos en el Ejemplo 7.

5

[Tabla 7]

Equilibrado	D-PBS
Lavado 1	Arg-HCl/D-PBS 400 mM
Lavado 2	Tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 6,0
Elución	Ácido acético 50 mM

El resultado del análisis de cromatografía de intercambio catiónico de cada fracción eluida se muestra en las Tablas 8 y 9. Como se muestra en la Tabla 8, con respecto a Q499-z118/J339-z119/I377-k, la relación de componentes de cada fracción eluida no es muy diferente de la del control. La razón es probablemente que las tres especies J339-z119/I377-k (un anticuerpo homomérico contra FX), Q499-z118/I377-k (un anticuerpo homomérico contra F.IX) y Q499-z118/J339-z119/I377-k (un anticuerpo heteromérico) tenían dos sitios de unión para la proteína modificada, y por lo tanto no hubo diferencia en términos de asociación/disociación durante la etapa de purificación basada en proteína A.

10

15

Entre tanto, en el caso de Q499-z121/J339-z119/I377-k, la relación de Q499-z121/I377-k (un anticuerpo homomérico contra F.IX) en la fracción eluida se redujo relación en comparación con el control como se muestra en Tabla 9. Por el contrario, las relaciones de J339-z119/I377-k (un anticuerpo homomérico contra FX) y Q499-z121/J339-z119/I377-k (un anticuerpo heteromérico) en la fracción eluida aumentaron relativamente en comparación con el control junto con una disminución de Q499-z121/I377-k. Se creía que esto se debía a que J339-z119/I377-k (un anticuerpo homomérico contra F.X) tiene dos sitios de unión para la proteína A modificada y Q499-z121/J339-z119/I377-k (un anticuerpo heteromérico) tiene uno. Sin embargo, Q499-z121/I377-k (un anticuerpo homomérico contra F.IX) no tiene sitio de unión y, en consecuencia, la mayoría de Q499-z121/I377-k pasó a través de la columna sin unirse a la proteína A modificada.

20

25

Tal como se ha descrito anteriormente, la presente invención también demuestra que con respecto a los anticuerpos cuyas regiones variables tienen actividad de unión a proteína A, cuando la proteína A modificada se combina con una modificación que conduce a la pérdida de afinidad de unión a proteína A, uno de los anticuerpos homoméricos puede disminuir significativamente y, como resultado, la pureza del anticuerpo heteromérico aumenta por la etapa de purificación basada en proteína A sola.

30

[Tabla 8]

Q499-z118/J339-z119/I377-k		
Área de pico (%)	Control	Fracción eluida
J339-z119/I377-k	2,3	4,2
Q499-z118/J339-z119/I377-k	75,5	79,1
Q499-z118/I377-k	22,3	16,7

[Tabla 9]

Q499-z121/J339-z119/I377-k		
Área de pico (%)	Control	Fracción eluida
J339-z119/I377-k	3,2	5,9
Q499-z121/J339-z119/I377-k	76,6	91,6
Q499-z121/I377-k	20,2	2,5

35

[Ejemplo 7] Evaluación de la farmacocinética en ratones transgénicos con FcRn humano Se evaluaron Q499-z118/J339-z119/I377-k y Q499-z121/J339-z119/I377-k preparados como se describe en el Ejemplo 6 por determinar su farmacocinética.

40

Es probable que sea difícil ajustar la actividad de unión a proteína A sin pérdida de la unión a FcRn humano, porque la proteína A y el FcRn humano reconocen el mismo sitio en un anticuerpo IgG (J Immunol. 2000 164 (10):5313-8) como se muestra en la figura 2. Conservar la afinidad de unión por FcRn humano es muy importante para la retención en plasma larga (semivida larga) en seres humanos, que es característica de los anticuerpos de tipo IgG. En este

contexto, la farmacocinética se comparó entre Q499-z118/J339-z119/I377-k y Q499-z121/J339-z119/I377-k preparados como se describe en el Ejemplo 6.

En un experimento farmacocinético para predecir la semivida en seres humanos, la farmacocinética en ratones transgénicos con FcRn humano (ratones B6.mFcRn -/-, HFcRn Tg línea 276+/+, Jackson Laboratories) se evaluó mediante el siguiente procedimiento. Q499-z118/J339-z119/I377-k y Q499-z121/J339-z119/I377-k se administraron cada uno por vía intravenosa una vez a una dosis de 5 mg/kg a los ratones, y se recogió sangre en los puntos de tiempo apropiados. La sangre recogida se centrifugó inmediatamente a 15.000 rpm y 4°C durante 15 minutos para obtener plasma sanguíneo. El plasma separado se almacenó en un congelador a -20°C o menos hasta su uso. La concentración en sangre se determinó por ELISA.

Como se muestra en la Fig. 3, el resultado indica que Q499-z118/J339-z119/I377-k y Q499-z121/J339-z119/I377-k fueron comparables entre sí en términos de retención en plasma. Por lo tanto, se demostró que, z121/z119, una región constante en la que cualquiera de las cadenas H se introduce con una modificación que conduce a la pérdida de la capacidad de unión a proteína A es comparable en términos de retención en plasma a z118/z119, que no tiene la modificación que conduce a la pérdida de afinidad de unión a proteína A. Tal como se ha descrito anteriormente, los presentes inventores revelaron una modificación (por ejemplo, una mutación por sustitución de Arg por el aminoácido en la posición 435, numeración EU) que conduce a la pérdida de la capacidad de unión a proteína A pero no tiene influencia en la farmacocinética, y que permite un aislamiento/purificación eficaces del anticuerpo heteromérico a alta pureza a través de la etapa de purificación basada en proteína A sola, independientemente de la región variable.

[Ejemplo 8] Introducción de mutaciones en el dominio CH3 de GC33-IgG1-CD3-scFv y preparación de moléculas diseñadas a través de la etapa de purificación basada en proteína A sola

Introducción de mutaciones para la purificación basada en proteína A de la molécula GC33-IgG1-CD3-scFv

Los inventores diseñaron una molécula de anticuerpo IgG anti-GPC3 en la que un anticuerpo scFv anti-CD3 está unido a una de las dos cadenas H (Fig. 4). Se esperaba que esta molécula fuera capaz de destruir células cancerosas reclutando linfocitos T a células cancerosas a través de la unión divalente a glipicano-3(GPC3), un antígeno específico de cáncer, y de la unión monovalente a CD3, un antígeno de linfocitos T. Un anticuerpo scFv anti-CD3 debe estar unido a únicamente una de las dos cadenas H para lograr la unión monovalente a CD3. En este caso, es necesario purificar la molécula formada por asociación heteromérica de los dos tipos de cadenas H.

Por lo tanto, usando el mismo método descrito en el Ejemplo 3, se introdujo una mutación por sustitución de Arg por His en la posición 435 (numeración EU) en una de las cadenas H. Asimismo, la mutación anterior se combinó con las mutaciones (se introduce una sustitución de Lys por Asp en la posición 356, numeración EU, en una cadena H y se introduce una sustitución de Glu por Lys en la posición 439, numeración EU, en la otra cadena H) descritas en el documento WO 2006/106905 (PROCESS FOR PRODUCTION OF POLYPEPTIDE BY REGULATION OF ASSEMBLY) como una modificación para potenciar la asociación heteromérica de las dos cadenas H. Los presentes inventores probaron si era posible, con las mutaciones combinadas, purificar la molécula de interés por cromatografía con proteína A sola.

Construcción de vectores de expresión para genes de anticuerpos y expresión de anticuerpos correspondientes

Se construyó el gen que codifica GPC3 (región variable de la cadena H del anticuerpo anti-glipicano-3 humano, SEQ ID NO: 22) como una región variable de la cadena H del anticuerpo mediante un método conocido por los expertos en la materia. Asimismo, se construyó el gen que codifica Gc33-k0 (cadena L del anticuerpo anti-glipicano-3 humano, SEQ ID NO: 23) como una cadena L del anticuerpo mediante un método conocido por los expertos en la materia. Además, los genes descritos a continuación se construyeron como una región constante de cadena H de anticuerpo mediante un método conocido por los expertos en la materia.

LALA-G1d (SEQ ID NO: 24), que se construyó a partir de IgG1 sustituyendo Ala por Leu en las posiciones 234 y 235 (numeración EU), y Ala por Asn en la posición 297 (numeración EU), y eliminando las Gly y Lys C-terminales LALA-G1d-CD3 (SEQ ID NO: 25), que se construyó a partir de LALA-G1d mediante la unión de un scFv anti-CD3 (en el que la región variable de la cadena H del anticuerpo anti-CD3 humano se une mediante un enlazador peptídico al extremos C de la región variable de la cadena L del anticuerpo anti-CD3 humano)  
 LALA-G3S3E-G1d (SEQ ID NO: 26), que se construyó a partir de LALA-G1d sustituyendo Arg por His en la posición 435 (numeración EU) y Glu por Lys en la posición 439 (numeración EU); y  
 LALA-S3K-G1d-CD3 (SEQ ID NO: 27), que se construyó a partir de LALA-G1d-CD3 sustituyendo Lys por Asp en la posición 356 (numeración EU).

Los genes NTA1L y NTA1R de la cadena H del anticuerpo anti-GPC3 humano se construyeron uniendo respectivamente LALA-G1d-CD3 (en el que un anticuerpo scFv anti-CD3 se une a la región constante de la cadena H) y LALA-G1d (una región constante de cadena H) cadena abajo de GPC3, que es la región variable de la cadena H de un anticuerpo anti-glipicano-3 humano. Asimismo, los genes NTA2L y NTA2R de la cadena H del anticuerpo anti-GPC3 humano se construyeron uniendo un anticuerpo scFv anti-CD3 cadena abajo de GPC3 como una región

## ES 2 777 901 T3

constante de cadena H, y uniendo LALA-S3K-G1d-CD3 introducido con una mutación por sustitución de Lys por Asp en la posición 356 (Numeración EU) o LALA-G3S3E-G1d introducido con mutaciones por sustitución de Arg para His en la posición 435 (numeración EU) y de Glu para Lys en la posición 439 (numeración EU). Los genes construidos se enumeraron a continuación.

5 Cadena H

NTA1L: GPC3-LALA-G1d-CD3  
NTA1R: GPC3-LALA-G1d  
NTA2L: GPC3-LALA-S3K-G1d-CD3  
NTA2R: GPC3-LALA-G3S3E-G1d

Cadena L

10 GC33-k0 Cada uno de los genes de anticuerpos (cadenas H: NTA1L, NTA1R, NTA2L y NTA2R; Cadena L: GC33-k0) se insertó en un vector de expresión de células animales. Usando un método conocido por los expertos en la materia, los anticuerpos enumerados a continuación se expresaron transitoriamente en células FreeStyle293 (Invitrogen) mediante la transfección de las células con los vectores de expresión construidos. Como se muestra a continuación, los anticuerpos se nombraron usando las combinaciones de genes de anticuerpos transfectados (primera cadena H/segunda cadena H /cadena L).

15

NTA1L/NTA1R/GC33-k0

NTA2L/NTA2R/GC33-k0

20 Purificación de proteínas de las muestras expresadas y evaluación del rendimiento del heterodímero

Se usaron como muestra sobrenadantes de cultivo de células FreeStyle293 (CM) que contenían los siguientes anticuerpos.

25

NTA1L/NTA1R/GC33-k0

NTA2L/NTA2R/GC33-k0

30 Las muestras de CM se filtraron a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 µm, y se cargaron en una columna rProtein A Sepharose de Flujo Rápido (GE Healthcare) equilibrada con D-PBS. La columna se sometió a lavados 1 y 2 y elución 1 como se muestra en la Tabla 10. El volumen de CM a cargar en la columna se ajustó a 20 mg de anticuerpo/ml de resina. Se recogieron fracciones correspondientes eluidas en cada condición y se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño para identificar sus componentes.

35

[Tabla 10]

Equilibrado	D-PBS
Lavado 1	Acetato de sodio 1 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5
Lavado 2	HCl 0,3 mM, NaCl 150 mM, pH 3,7
Elución 1	HCl 2 mM, pH 2. 7

El resultado de la cromatografía de exclusión por tamaño de cada fracción eluida se muestra en la Fig. 5 y en la Tabla 11 a continuación. Los valores representan el área del pico de elución expresada en porcentaje. Para NTA1L/NTA1R/GC33-k0 y NTA2L/NTA2R/GC33-k0, los anticuerpos homoméricos (anticuerpos con NTA1L homomérico o NTA2L homomérico) que tienen el anticuerpo scFv anti-CD3 en ambas cadenas eran casi indetectables. Se cree que esto se debe al nivel de expresión extremadamente bajo de las cadenas H que contienen el anticuerpo scFv anti-CD3 porque el nivel de expresión de una molécula scFv es generalmente bajo. En cuanto a los anticuerpos homoméricos que no contienen el anticuerpo scFv anti-CD3 en sus dos cadenas, se observó aproximadamente el 76 % del anticuerpo homomérico NTA1R en el caso de NTA1L/NTA1R/GC33-k0, mientras que solo se observó aproximadamente el 2 % del anticuerpo NTA2R homomérico en el caso de NTA2L/NTA2R/GC33-k0. Por lo tanto, la presente invención demostró que cuando las mutaciones por sustitución de Lys por Glu en la posición 356 (numeración EU) y de Glu por Lys en la posición 439 (numeración EU) para la formación eficaz de moléculas heteroméricas a partir de las cadenas H correspondientes, se combinaban con la mutación por sustitución de Arg por His en la posición 435 (numeración EU), el anticuerpo heteromérico (anticuerpo biespecífico de interés) podría purificarse eficazmente a una pureza del 98 % o mayor a través de la etapa de purificación basada en proteína A sola.

50

[Tabla 11]

	homodímero NTA1R	heterodímero NTA1L/NTA1R	homodímero NTA1R
NTA1L/NTA1R/GC33-k0	0,7	23,5	75,8
NTA2L/NTA2R/GC33-k0	1,8	98,2	-

[Ejemplo 9] Introducción de mutaciones en el dominio CH3 de anticuerpos monovalentes y preparación de moléculas diseñadas a través de la etapa de purificación basada en proteína A sola

5 Introducción de mutaciones para la purificación de moléculas de anticuerpos monovalentes utilizando la proteína A

10 Un anticuerpo IgG anti-GPC3 normal se une de forma divalente a través de las dos cadenas H al glipicano-3 (GPC3), un antígeno específico del cáncer. En el experimento descrito en este Ejemplo, los inventores diseñaron y evaluaron una molécula de anticuerpo IgG anti-GPC3 (Fig. 6) que se une de forma monovalente a glipicano-3. Se cree que, en comparación con los anticuerpos divalentes normales, la unión monovalente de la molécula a glipicano-3 (GPC3), un antígeno específico del cáncer, se basó en la afinidad y no en la avidéz. Por lo tanto, se esperaba que la molécula fuera capaz de unirse al antígeno sin entrecruzamiento. Para lograr la unión monovalente de las dos cadenas H a glipicano-3 (GPC3), una debe ser una cadena H que consiste en un dominio bisagra-Fc que carece de la región variable y del dominio CH1, mientras que la otra es una cadena H normal. En este caso, es necesario purificar la molécula que es el resultado de la asociación heteromérica de los dos tipos de cadenas H.

20 Por lo tanto, usando el mismo método como se describe en el Ejemplo 3, se introdujo una mutación por sustitución de Arg por His en la posición 435 (numeración EU) en una de las cadenas H. Asimismo, la mutación anterior se combinó con las mutaciones (se introduce una sustitución de Lys por Asp en la posición 356, numeración EU, en una cadena H y se introduce una sustitución de Glu por Lys en la posición 439, numeración EU, en la otra cadena H) descritas en el documento WO 2006/106905 (PROCESS FOR PRODUCTION OF POLYPEPTIDE BY REGULATION OF ASSEMBLY) como una modificación para potenciar la asociación heteromérica de las dos cadenas H. Los presentes inventores evaluaron si era posible, con las mutaciones combinadas, purificar la molécula de interés por cromatografía con proteína A sola.

25 Construcción de vectores de expresión para genes de anticuerpos y expresión de anticuerpos correspondientes

30 La región variable de cadena H del anticuerpo utilizada fue: GPC3 (la región variable de la cadena H de un anticuerpo anti-glipicano-3 humano, SEQ ID NO: 22). La cadena L del anticuerpo usada fue: GC33-k0 (la cadena L de un anticuerpo anti-glipicano-3 humano, SEQ ID NO: 23). Las regiones constantes de cadena H de anticuerpo utilizadas fueron:

35 LALA-G1d (SEQ ID NO: 24), que se construyó a partir de IgG1 introduciendo mutaciones por sustitución de Ala por Leu en las posiciones 234 y 235 (numeración EU), y de Ala por Asn en la posición 297 (numeración EU), y eliminando las Gly y Lys C-terminales;  
 LALA-G3-G1d (SEQ ID NO: 28), que se construyó a partir de LALA-G1d introduciendo una mutación por sustitución de Arg por His en la posición 435 (numeración EU);  
 40 LALA-G3S3E-G1d (SEQ ID NO: 26), que se construyó a partir de LALA-G3-G1d introduciendo una mutación por sustitución de Glu por Lys en la posición 439 (numeración EU);  
 LALA-G1Fc (SEQ ID NO: 29), que se construyó a partir de LALA-G1d eliminando la región de las posiciones 1 a 215 (numeración EU); y  
 LALA-G1Fc-S3K (SEQ ID NO: 30), que se construyó a partir de G1Fc introduciendo una mutación por sustitución de Lys por Asp en la posición 356 (numeración EU).

45 Los genes NTA4L-cont, NTL4L-G3 y NTA4L de la cadena H del anticuerpo anti-GPC3 humano, se construyeron uniendo cadena abajo de GPC3 (la región variable de la cadena H de un anticuerpo anti-glipicano-3 humano), respectivamente, LALA-G1d (una región constante de cadena H), LALA-G3-G1d introducido con una mutación por sustitución de Arg por His en la posición 435 (numeración EU), y LALA-G3S3E-G1d introducido con mutaciones por sustitución de Arg por His en la posición 435 (numeración EU) y de Glu para Lys en la posición 439 (numeración EU). Asimismo, Los genes Fc NTA4R-cont y NTA4R se construyeron usando LALA-G1Fc (un dominio anti-Fc bisagra humano) y LALA-G1Fc-S3K (un dominio Fc bisagra introducido con una mutación por sustitución de Lys por Asp en la posición 356, numeración EU). Los genes construidos son:

55 Cadena H

NTA4L-cont: GPC3-LALA-G1d  
 NTA4L-G3: GPC3-LALA-G3-G1d  
 NTA4L: GPC3-LALA-G3S3E-G1d  
 60 NTA4R-cont: LALA-G1Fc

NTA4R: LALA-G1Fc-S3K

Cadena L  
GC33-k0

5 Los genes de anticuerpos (NTA4L, NTA4L-cont, NTA4L-G3, NTA4R, NTA4R-cont y Gc33-k0) se insertaron cada uno en un vector de expresión de células animales.

10 Los siguientes anticuerpos se expresaron transitoriamente en células FreeStyle293 (Invitrogen) mediante transfección usando los vectores de expresión construidos. Como se muestra a continuación, los anticuerpos se nombraron usando las combinaciones de genes de anticuerpos transfectados.

NTA4L-cont/NTA4R-cont/GC33-k0  
NTA4L-G3/NTA4R-cont/GC33-k0  
NTA4L/NTA4R/GC33-k0

15 Purificación de proteínas de las muestras expresadas y evaluación del rendimiento del heterodímero

El CM que contiene el siguiente anticuerpo se utilizó como muestra:

20 NTA4L-cont/NTA4R-cont/GC33-k0

NTA4L-G3/NTA4R-cont/GC33-k0

25 NTA4L/NTA4R/GC33-k0

30 Las muestras de CM se filtraron a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 µm, y se cargaron en una columna rProtein A Sepharose de Flujo Rápido (GE Healthcare) equilibrada con D-PBS. La columna se sometió a lavados 1 y 2 y elución 1 como se muestra en la Tabla 12. El volumen de CM a cargar en la columna se ajustó a 20 mg de anticuerpo/ml de resina. Se recogieron fracciones correspondientes eluidas en cada condición y se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño para identificar sus componentes.

[Tabla 12]

Equilibrado	D-PBS
Lavado 1	Acetato de sodio 1 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5
Lavado 2	HCl 0,3 mM, NaCl 150 mM, pH 3,7
Elución 1	HCl 2 mM, pH 2. 7

35 El resultado de la cromatografía de exclusión por tamaño de cada fracción eluida se muestra en la Fig. 7 y en la Tabla 13 a continuación. Los valores representan el área del pico de elución expresada en porcentaje.

40 En cuanto a NTA4L-cont/NTA4R-cont/GC33-k0, se eluyeron el anticuerpo homomérico que se une de forma divalente a GPC3 (anticuerpo homomérico NTA4L-cont) y la molécula homomérica que no tiene dominio de unión a GPC3 (anticuerpo homomérico NTA4R-cont), mientras que el anticuerpo heteromérico de interés, NTA4L-cont/NTA4R-cont, representó solamente el 46,5 %.

45 En el caso de NTA4L-G3/NTA4R-cont/GC33-k0, el anticuerpo homomérico que se une de forma divalente a GPC3 (anticuerpo homomérico NTA4L-G3) fue casi indetectable, mientras que la molécula homomérica que no tiene dominio de unión a GPC3 (anticuerpo homomérico NTA4R-cont) fue abundante. El anticuerpo heteromérico de interés, NTA4L-G3/NTA4R-cont, representó el 66,7 %. En el caso de NTA4L/NTA4R/GC33-k0, el anticuerpo homomérico que se une de forma divalente a GPC3 (anticuerpo homomérico NTA4L) fue casi indetectable, y la proporción de la molécula homomérica que no tiene dominio de unión a GPC3 (NTA4R) se redujo considerablemente, lo que dio como resultado un aumento significativo de hasta un 93,0 % en la proporción del anticuerpo heteromérico de interés, NTA4L/NTA4R. Por lo tanto, la presente invención demostró que cuando se introdujeron las mutaciones por sustitución de Lys por Asp en la posición 356 (numeración EU) y de Glu por Lys en la posición 439 (numeración EU) para la formación eficaz de moléculas heteroméricas a partir de las cadenas H correspondientes en combinación con la mutación por sustitución de Arg por His en la posición 435 (numeración EU), el anticuerpo heteromérico (un anticuerpo biespecífico de interés) podría purificarse eficazmente a una pureza del 93 % o mayor a través de la etapa de purificación basada en proteína A sola.

55



[Tabla 13]

	Anticuerpo anti-GPC3 homomérico	Anticuerpo heteromérico	Molécula Fc homomérica
NTA4L-cont/NTA4R-cont/GC33-k0	30,0	46,5	23,5
NTA4L-G3/NTA4R-cont/GG33-k0	-	66,7	33,3
NTA4L/NTA4R/GG33-k0	-	93,0	7,0

[Ejemplo 10] Preparación de anticuerpos heteroméricos a través de una etapa de purificación por cromatografía en columna con proteína A usando elución con gradiente de pH

5 Como se describe en el Ejemplo 9, los presentes inventores demostraron que en el caso de un anticuerpo que tiene la región variable únicamente en un brazo, el anticuerpo heteromérico podría purificarse eficientemente a través de la etapa de purificación basada en proteína A sola combinando la mutación por sustitución de Arg por His en la posición 435 (numeración EU) con las mutaciones (se introduce una sustitución de Lys por Asp en la posición 356, numeración EU, en una cadena H y se introduce una sustitución de Glu por Lys en la posición 439, numeración EU, en la otra cadena H) descritas en el documento WO 2006/106905 (PROCESS FOR PRODUCTION OF POLYPEPTIDE BY REGULATION OF ASSEMBLY). Sin embargo, el anticuerpo heteromérico no se purifica a una pureza suficientemente alta con la elución 1 (tampón de elución: HCl 2 mM, pH 2,7) solamente. Se necesita una etapa de purificación adicional.

15 Después, en este ejemplo, los presentes inventores evaluaron si el anticuerpo heteromérico puede aislarse y purificarse a alta pureza mediante cromatografía en columna con proteína A usando elución con un gradiente de pH. Esto se basó en el supuesto de que más sitios de unión a proteína A conducen a una unión más fuerte del anticuerpo heteromérico a la proteína A, y como resultado se necesita un pH más bajo para la elución. La purificación se puede lograr de manera más eficaz a un coste menor cuando la pureza del anticuerpo heteromérico se puede aumentar a casi el 100 % usando dicha elución con gradiente de pH.

20 Se usaron muestras de CM que contenían los siguientes anticuerpos:

25 NTA4L-cont/NTA4R-cont/GC33-k0  
NTA4L-G3/NTA4R-cont/GC33-k0  
NTA4L/NTA4R/GC33-k0

30 Las muestras de CM se filtraron a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 µm, y se cargaron en una columna HP de proteína A HiTrap (GE Healthcare) equilibrada con D-PBS. La columna se sometió secuencialmente a lavados 1 y 2 y después se eluyó con un gradiente de pH usando elución A y B como se muestra en la Tabla 14. La elución con gradiente de pH se logró con el siguiente gradiente lineal: elución A/elución B = (100:0) → (30:70) durante 35 minutos. Las fracciones eluidas se recogieron y analizaron mediante análisis de cromatografía de exclusión por tamaño para identificar sus componentes.

Tabla 14]

Equilibrado	D-PBS
Lavado 1	D-PBS
Lavado 2	Citrato de sodio 20 mM, pH 5,0
Elución A	Citrato de sodio 20 mM, pH 5,0
Elución B	Citrato de sodio 20 mM, pH 2,7

35 NTA4L-cont/NTA4R-cont/GC33-k0, NTA4L-G3/NTA4R-cont/GC33-k0 y NTA4L/NTA4R/GC33-k0 se purificaron por cromatografía en columna con proteína A en condiciones de elución con gradiente de pH. Los cromatogramas resultantes se muestran en la Fig. 8. La elución de NTA4L-cont/NTA4R-cont/GC33-k0 dio como resultado un pico amplio. Entre tanto, la elución con gradiente de pH de NTA4L-G3/NTA4R-cont/GC33-k0 dio dos picos de elución. Los picos de pH alto y bajo se marcaron como "elución 1" y "elución 2", respectivamente. El resultado para NTA4L/NTA4R/GC33-k0 fue aproximadamente el mismo que para NTA4L-G3/NTA4R-cont/GC33-k0, excepto que el área del pico de elución 2 fue menor.

45 El resultado del análisis de cromatografía de exclusión por tamaño de cada pico se muestra en la Tabla 15. NTA4L-cont/NTA4R-cont/GC33-k0 dio tres componentes eluidos en este orden: un anticuerpo homomérico que se une de forma divalente a GPC3 (anticuerpo homomérico NTA4L-cont), un anticuerpo heteromérico que se une de forma monovalente a GPC3 (anticuerpo heteromérico NTA4L-cont/NTA4R-cont) y una molécula homomérica que no tiene dominio de unión a GPC3 (anticuerpo homomérico NTA4R-cont). Se cree que la razón por la cual estos componentes no se separaron por elución con gradiente de pH es que tienen el mismo número (dos) de sitios de unión a proteína

A. Entre tanto, se reveló que en la elución 1 de NTA4L-G3/NTA4R-cont/GC33-k0, los niveles de anticuerpo homomérico que se une de forma divalente a GPC3 (anticuerpo homomérico NTA4L-G3) y a la molécula homomérica que no tiene dominio de unión a GPC3 (anticuerpo homomérico NTA4R -cont) estaban por debajo del límite de detección, mientras que el anticuerpo heteromérico que se une de forma monovalente a GPC3 (anticuerpo heteromérico NTA4L-G3/NTA4R-conc) representaba el 99,6 %. En la elución 2, se descubrió que la molécula homomérica que no tiene dominio de unión a GPC3 (anticuerpo homomérico NTA4R-cont) representaba el 98,8 %. El anticuerpo homomérico NTA4L-G3 pasa a través de la columna con proteína A porque no puede unirse a la proteína A debido a la mutación por sustitución de Arg por His en la posición 435 (numeración EU). Entre tanto, el anticuerpo heteromérico NTA4L-G3/NTA4R-conc tiene un único sitio de unión a proteína A, mientras que el anticuerpo homomérico NTA4R-cont tiene dos. Más sitios de unión a proteína A significa una unión más fuerte a la proteína A, y como resultado se requirió un pH más bajo para la elución. Se cree que esta es la razón por la cual el anticuerpo homomérico NTA4R-cont se eluyó a un pH más bajo que el anticuerpo heteromérico NTA4L-G3/NTA4R-conc. Se obtuvo casi el mismo resultado para NTA4L/NTA4R/GC33-k0. El resultado del análisis de cromatografía de exclusión por tamaño muestra que la relación de componentes era comparable a la de NTA4L-G3/NTA4R-cont/GC33-k0. Hubo una diferencia entre los cromatogramas con proteína A, y la relación de las áreas del pico de elución 2 a elución 1 fue menor en NTA4L/NTA4R/GC33-k0. La relación de la expresión del anticuerpo homomérico NTA4R-cont, que es el componente principal de la elución 2, se redujo debido a las mutaciones introducidas para la generación eficaz del anticuerpo heteromérico NTA4L-G3/NTA4R-conc. Las mutaciones de aminoácidos descritas anteriormente mejoraron el rendimiento de purificación del anticuerpo heteromérico y la fuerza de la purificación por cromatografía en columna con proteína A con elución con gradiente de pH.

Tal como se ha descrito anteriormente, los presentes inventores demostraron que el anticuerpo heteromérico podía aislarse y purificarse eficazmente a una alta pureza mediante la etapa de purificación usando cromatografía en columna con proteína A sola con elución con gradiente de pH.

[Tabla 15]

Área de pico (%)		Anticuerpo homomérico que se une de forma divalente a GPC3	Anticuerpo heteromérico que se une de forma monovalente a GPC3	Molécula homomérica que no tiene dominio de unión a GPC3
NTA4L-cont/NTA4R-cont/GC33-k0	Elución	25,4	54,4	20,2
NTA4L-G3/NTA4R-cont/GG33-k0	Elución 1	ND	99,6	ND
	Elución 2	-	1,2	98,8
NTA4L/NTA4R/GC33-k0	Elución 1	ND	99,6	ND
	Elución 2	-	1,4	98,6

[Ejemplo 11] Introducción de mutación en el dominio CH3 de la proteína de fusión receptor Fc alfa-Fc y preparación de moléculas diseñadas a través de la etapa de purificación basada en proteína A sola

Introducción de la mutación en el dominio CH3 y preparación de la proteína de fusión monovalente del receptor Fc alfa-Fc a través de la etapa de purificación basada en la proteína A

Las proteínas de fusión convencionales del receptor Fc-Fc como Eternercept y Abatacept son homodímeros que pueden unirse de forma divalente a los ligandos. En el experimento descrito en este Ejemplo, los inventores diseñaron y evaluaron una proteína de fusión receptor Fc-Fc que se une de forma monovalente a IgA como ligando (Fig. 9). Para lograr la unión monovalente del receptor Fc alfa a IgA, una de las dos cadenas H de la proteína de fusión receptor Fc-Fc debe ser la cadena H completa que tiene el dominio bisagra-Fc. En este caso, es necesario purificar la molécula que es el resultado de la asociación heteromérica de los dos tipos de cadenas H

Por lo tanto, usando el mismo método descrito en el Ejemplo 6, se introdujo una mutación por sustitución de Arg por His en la posición 435 (numeración EU) en las dos cadenas H. Asimismo, la mutación anterior se combinó con las mutaciones (se introduce una sustitución de Lys por Asp en la posición 356, numeración EU, en una cadena H y se introduce una sustitución de Glu por Lys en la posición 439, numeración EU, en la otra cadena H) descritas en el documento WO 2006/106905 (PROCESS FOR PRODUCTION OF POLYPEPTIDE BY REGULATION OF ASSEMBLY) como una modificación para potenciar la asociación heteromérica de los dos tipos de cadenas H. Los presentes inventores evaluaron si era posible, con las mutaciones combinadas, purificar la molécula de interés por

cromatografía con proteína A sola.

Construcción de vectores de expresión para genes de anticuerpos y expresión de anticuerpos correspondientes

5 El receptor de Fc utilizado fue Fc $\alpha$ R (receptor de IgA1 humano, SEQ ID NO: 31). Las regiones constantes de la cadena H de fusión utilizadas fueron:

G1Fc (SEQ ID NO: 32), que es un dominio humano bisagra-Fc construido a partir de IgG1 eliminando las Gly y Lys C-terminales, y los restos de las posiciones 1 a 223 (numeración EU);

10 G1Fc-G3S3K (SEQ ID NO: 33), que se construyó a partir de G1Fc mediante la introducción de mutaciones por sustitución de Lys por Asp en la posición 356 (numeración EU) y de Arg por His en la posición 435 (numeración EU); y

G1Fc-S3E (SEQ ID NO: 34), que se construyó a partir de G1Fc mediante la introducción de una mutación por sustitución de Glu por Lys en la posición 439 (numeración EU).

15 Las proteínas de fusión Fc $\alpha$ R-Fc, IAL-cont e IAL, se construyeron uniendo cadena abajo de Fc $\alpha$ R a través de un enlazador polipeptídico (SEQ ID NO: 35), G1Fc (una región constante de cadena H) y G1Fc-G3S3K introducidos con mutaciones por sustitución de Lys por Asp en posición 356 (numeración EU) y de Arg por His en la posición 435 (numeración EU).

20 Asimismo, los genes IAR-cont e IAR de Fc se construyeron para codificar G1Fc (un dominio bisagra-Fc humano) y G1Fc-S3E (un dominio Fc bisagra introducido con una mutación por sustitución de Glu por Lys en la posición 439, numeración EU), respectivamente. Los genes construidos fueron:

Cadena H

25 IAL-cont: Fc $\alpha$ R-G1Fc  
IAL: Fc $\alpha$ R-G1Fc-G3S3K  
IAR-cont: G1Fc  
IAR: G1Fc-S3E

30 Los genes de los anticuerpos (IAL-cont, IAL, IAR-cont, and IAR) se insertaron cada uno en un vector de expresión de células animales.

35 Los siguientes anticuerpos se expresaron transitoriamente en células FreeStyle293 (Invitrogen) mediante transfección usando los vectores de expresión construidos. Como se muestra a continuación, los anticuerpos se nombraron usando las combinaciones de genes de anticuerpos transfectados.

IAL-cont/IAR-cont

IAL/IAR

40 Purificación de proteínas de la muestra expresada y evaluación del rendimiento del heterodímero

Se usaron muestras de CM que contenían el siguiente anticuerpo:

45 IAL-cont/IAR-cont

IAL/IAR

50 Las muestras de CM se filtraron a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22  $\mu$ m, y se cargaron en una columna rProtein A Sepharose de Flujo Rápido (GE Healthcare) equilibrada con D-PBS. La columna se sometió a lavados 1 y 2 y elución 1 como se muestra en la Tabla 16. El volumen de CM a cargar en la columna se ajustó a 20 mg de anticuerpo/ml de resina. Se recogieron fracciones correspondientes eluidas en cada condición y se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño para identificar sus componentes.

55 [Tabla 16]

Equilibrado	D-PBS
Lavado 1	Acetato de sodio 1 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5
Lavado 2	HCl 0,3 mM, NaCl 150 mM, pH 3,7
Elución 1	HCl 2 mM, pH 2. 7

El resultado del análisis de la cromatografía de exclusión por tamaño de cada fracción eluida se muestra en la Fig. 10 y en la Tabla 17 a continuación. Los valores representan el área del pico de elución expresada en porcentaje. En cuanto a IAL-cont/IAR-cont, se eluyeron un anticuerpo homomérico que se une de forma divalente a IgA (anticuerpo

homomérico IAL-cont) y una molécula homomérica que no tiene sitio de unión a IgA (anticuerpo homomérico IAR-cont), mientras que el anticuerpo heteromérico IAL -cont/IAR-cont de interés representó solamente el 30 %. En el caso de IAL/IAR, el anticuerpo homomérico que se une de forma divalente a IgA (anticuerpo homomérico IAL) no fue detectable, y la proporción de la molécula homomérica que no tiene sitio de unión a IgA (anticuerpo homomérico IAR) se redujo considerablemente; por lo tanto, el anticuerpo heteromérico IAL/IAR de interés aumentó significativamente hasta aproximadamente el 96 %. Por lo tanto, la presente invención demostró que cuando se introdujeron las mutaciones por sustitución de Lys por Asp en la posición 356 (numeración EU) y de Glu por Lys en la posición 439 (numeración EU) para la formación eficaz de moléculas heteroméricas a partir de las cadenas H correspondientes en combinación con la mutación por sustitución de Arg por His en la posición 435 (numeración EU), el anticuerpo heteromérico, un anticuerpo biespecífico de interés, podría purificarse eficazmente a una pureza del 95 % o mayor a través de la etapa de purificación basada en proteína A sola.

[Tabla 17]

	Anticuerpo IgA homomérico	Anticuerpo heteromérico	Molécula Fc homomérica
IAL-cont/IAR-cont	66,2 %	30,0 %	3,8 %
IAL/IAR	-	95,8 %	4,2 %

15 [Ejemplo 12] Construcción de un anticuerpo biespecífico del tipo IgG de cuatro cadenas

Construcción de vectores de expresión para genes de anticuerpos y expresión de anticuerpos correspondientes

20 El anticuerpo biespecífico contra F.IX humano y F.X humano, que se diseñó como se describe en el Ejemplo 1, consiste en una cadena L común y dos tipos de cadenas H que reconocen cada una un antígeno diferente. Obtener un anticuerpo biespecífico con dicha cadena L tan común no es fácil, porque es difícil para una secuencia de cadena L común reconocer dos tipos diferentes de antígenos. Tal como se ha descrito anteriormente, obtener una cadena L tan común es extremadamente difícil. Por lo tanto, se puede sospechar que una opción más preferida es un anticuerpo biespecífico que consiste en dos tipos de cadenas H y dos tipos de cadenas L que reconocen dos tipos de antígenos. Si se expresan dos tipos de cadenas H y dos tipos de cadenas L, forman diez tipos de moléculas de IgG H2L2 en combinaciones aleatorias. Es muy difícil purificar el anticuerpo biespecífico de interés de los diez tipos de anticuerpos.

30 En el experimento descrito en este Ejemplo, los presentes inventores prepararon y evaluaron anticuerpos biespecíficos que consisten en dos tipos de cadenas H y dos tipos de cadenas L contra el receptor de IL-6 humano y el glicoproteína-3 humano (GPC3). Para preparar eficazmente los anticuerpos biespecíficos que consisten en dos tipos de cadenas H y dos tipos de cadenas L, es necesario potenciar la asociación de cadenas H y cadenas L contra el mismo antígeno, así como la asociación heteromérica de dos tipos de cadenas H. Además, es esencial que el anticuerpo biespecífico con la combinación correcta pueda purificarse de los productos de expresión obtenidos.

35 Para potenciar la asociación entre las cadenas H y las cadenas L contra el mismo antígeno, la región variable (VH) de la cadena H (GC33-VH-CH1-bisagra-CH2-CH3) y la región variable (VL) de la cadena L (GC33- VL-CL) de GC33 (un anticuerpo anti-GPC3) se intercambiaron entre sí para producir la cadena H GC33-VL-CH1-bisagra-CH2-CH3 y la cadena L (GC33-VH-CL) (el dominio VH y el dominio VL se intercambiaron entre sí). GC33-VL-CH1-bisagra-CH2-CH3 está asociado con GC33-VH-CL; sin embargo, su asociación con la cadena L (MRA-VL-CL) del anticuerpo anti-receptor de IL-6 se inhibe debido a la inestabilidad de la interacción VL/VL. De manera análoga, la cadena H (MRA-VH-CH1-bisagra-CH2-CH3) del anticuerpo anti-receptor de IL-6 está asociada con MRA-VL-CL; sin embargo, su asociación con la cadena L (GC33-VH-CL) del anticuerpo anti-GPC3 se inhibe debido a la inestabilidad de la interacción VH/VH. Tal como se ha descrito anteriormente, es posible potenciar la asociación entre las cadenas H y las cadenas L contra el mismo antígeno. Sin embargo, la interacción VH/VH y la interacción VL/VL también se producen aunque son menos estables que la interacción VH/VL (para VH/VH, véanse: FEBS Lett. 20 de noviembre de 2003, 554(3):323-9; J Mol Biol. 17 de octubre de 2003, 333(2):355-65; para VL/VL, véanse: J Struct Biol. junio de 2002, 138(3):171-86; Proc Natl Acad Sci USA. julio de 1985, 82(14):4592-6), y así, aunque con poca frecuencia, también se produce una autoasociación desfavorable de las cadenas H y de las cadenas L. Por lo tanto, aunque el porcentaje del anticuerpo biespecífico de interés aumenta simplemente intercambiando el dominio VH y el dominio VL entre sí, los productos expresados aún contienen aproximadamente diez tipos de combinaciones.

55 En general, es extremadamente difícil purificar el anticuerpo biespecífico de interés de los diez tipos de anticuerpos. Sin embargo, es posible mejorar la separación de los diez tipos de componentes en la cromatografía de intercambio iónico mediante la introducción de una modificación para que los diez tipos de componentes tengan cada uno un punto isoeléctrico diferente. En este contexto, MRA-VH, que es la región variable de la cadena H de un anticuerpo anti-receptor de IL-6, se modificó para bajar el punto isoeléctrico, y esto produjo H54-VH con un punto isoeléctrico más bajo. De la misma manera, MRA-VL, que es la región variable de la cadena L de un anticuerpo anti-receptor de IL-6, se modificó para bajar el punto isoeléctrico, y esto produjo L28-VL con un punto isoeléctrico más bajo. Asimismo, GC33-VH, que es la región variable de la cadena H de un anticuerpo anti-GPC3, se modificó para aumentar el punto isoeléctrico. Esto produjo Hu22-VH con un punto isoeléctrico aumentado.

La combinación de las cadenas H y L de interés se mejoró intercambiando la VH y VL entre las cadenas H y las cadenas L de un anticuerpo anti-GPC3. Sin embargo, aunque con poca frecuencia, la asociación desfavorable de la cadena H/L se produce porque es imposible suprimir completamente la interacción H54-VH/Hu22-VH y la interacción L28-VL/GC33-VL. Una secuencia de anticuerpo normal tiene glutamina en la posición 39 en VH. En la interacción VH/VH, se cree que las glutaminas forman enlaces de hidrógeno en la interfaz VH/VH. Después, la lisina se substituyó por la glutamina en la posición 39 (numeración de Kabat) para alterar la interacción H54-VH/Hu22-VH. Por lo tanto, se esperaba que la interacción VH/VH se viera significativamente alterada debido a la repulsión electrostática entre dos lisinas en la interfaz VH/VH. A continuación, H54-VH-Q39K y Hu22-VH-Q39K se construyeron substituyendo lisina por glutamina en la posición 39 (numeración de Kabat) en las secuencias de H54-VH y Hu22-VH. De manera análoga, una secuencia de anticuerpo normal tiene glutamina en la posición 38 en VL. En la interacción VL/VL, se espera que las glutaminas formen enlaces de hidrógeno en la interfaz VL/VL. Después, el ácido glutámico se substituyó por la glutamina en la posición 38 (numeración de Kabat) para alterar la interacción L28-VL/GC33-VL. Por lo tanto, se esperaba que la interacción VL/VL se viera significativamente alterada debido a la repulsión electrostática entre dos ácidos glutámicos en la interfaz VL/VL. A continuación, L28-VL-Q38E y GC33-VL-Q38E se construyeron substituyendo el ácido glutámico por la glutamina en la posición 39 (numeración de Kabat) en las secuencias de L28-VL y GC33-VL.

Para mejorar adicionalmente la eficacia de la expresión/purificación del anticuerpo biespecífico de interés, se introdujo una mutación por substitución de Arg por His en la posición 435 (numeración EU) en una cadena H usando el mismo método descrito en el Ejemplo 3. Asimismo, la mutación anterior se combinó con las mutaciones (se introduce una substitución de Lys por Asp en la posición 356, numeración EU, en una cadena H y se introduce una substitución de Glu por Lys en la posición 439, numeración EU, en la otra cadena H) descritas en el documento WO 2006/106905 (PROCESS FOR PRODUCTION OF POLYPEPTIDE BY REGULATION OF ASSEMBLY) como una modificación para potenciar la asociación heteromérica de los dos tipos de cadenas H. Las mutaciones combinadas permiten la purificación de la molécula resultante de la asociación heteromérica de los dos tipos de cadenas H por cromatografía con proteína A sola.

De manera específica, las regiones variables de cadena H de anticuerpo utilizadas fueron:

MRA-VH (la región variable de la cadena H de un anticuerpo anti-receptor de interleucina-6 humano, SEQ ID NO: 36);  
 GC33-VH (la región variable de la cadena H de un anticuerpo anti-GPC3, SEQ ID NO: 37);  
 H54-VH (la región variable de la cadena H de un anticuerpo anti-receptor de interleucina-6 humano, SEQ ID NO: 38) con un punto isoelectrico más bajo que el de MRA-VH;  
 Hu22-VH (la región variable de la cadena H de un anticuerpo anti-GPC3, SEQ ID NO: 39) con un punto isoelectrico mayor que el de GC33-VH;  
 H54-VH-Q39K (SEQ ID NO: 40) donde la Lys está substituida por Gln en la posición 39 (numeración de Kabat) en la secuencia de H54-VH; y  
 Hu22-VH-Q39K (SEQ ID NO: 41) donde la Lys está substituida por Gln en la posición 39 en la secuencia de Hu22-VH.

También se usaron las siguientes regiones constantes de cadena H de anticuerpo:

IgG1-LALA-N297A-CH (SEQ ID NO: 42) donde la Ala está substituida por Leu en las posiciones 234 y 235 (numeración EU) y la Ala está substituida por Asn en la posición 297 (numeración EU), y las Gly y Lys C-terminales se eliminan en la secuencia de la región constante de la cadena H de IgG1;  
 IgG1-LALA-N297A-CHr (SEQ ID NO: 43) donde la secuencia de IgG1-LALA-N297A-CH tiene dos restos adicionales de Ser en el extremo N;  
 IgG1-LALA-N297A-s3-CH (SEQ ID NO: 44) donde el Glu está substituido por Lys en la posición 439 (numeración EU) en la secuencia de IgG1-LALA-N297A-CH; e IgG1-LALA-N297A-G3s3-CHr (SEQ ID NO: 45) donde la Lys está substituida por Asp en la posición 356 (numeración EU) y la Arg está substituida por His en la posición 435 (numeración EU) en la secuencia de IgG1-LALA-N297A-CHr.

Entre tanto, las regiones variables de cadena L de anticuerpo utilizadas fueron:

MRA-VL (la región variable de la cadena L de un anticuerpo anti-receptor de interleucina-6 humano, SEQ ID NO: 46);  
 GC33-VL (la región variable de la cadena L de un anticuerpo anti-GPC3, SEQ ID NO: 47);  
 L28-VL (la región variable de la cadena L de un anticuerpo anti-receptor de interleucina-6 humano, SEQ ID NO: 48) con un punto isoelectrico más bajo que el de MRA-VL;  
 L28-VL-Q38E (SEQ ID NO: 49) donde el Glu está substituido por Gln en la posición 38 (numeración de Kabat) en la secuencia de L28-VL; y  
 GC33-VL-Q38E (SEQ ID NO: 50) donde el Glu está substituido por Gln en la posición 38 (numeración de Kabat) en la secuencia de GC33-VL.

También se usaron las siguientes regiones constantes de cadena L de anticuerpo.

IgG1-CL (la región constante de la cadena L de IgG1, SEQ ID NO: 51).

IgG1-CLr (SEQ ID NO: 52), que se construyó sustituyendo Arg y Thr por las Ala y Ser C-terminales, respectivamente, en la secuencia de IgG1-CL.

5 El gen no1-Mh-H se construyó uniendo IgG1-LALA-N297A-CH cadena abajo de MRA-VH. El gen no1-Mh-L se construyó uniendo IgG1-CL cadena abajo de MRA-VL. El gen no1-Gh-H se construyó uniendo IgG1-LALA-N297A-CH cadena abajo de GC33-VH. El gen no1-Gh-L se construyó uniendo IgG1-CL cadena abajo de GC33-VL. El gen no2-Gh-H se construyó uniendo IgG1-LALA-N297A-CHr cadena abajo de GC33-VL. El gen no2-Gh-L se construyó uniendo IgG1-CLr cadena abajo de GC33-VH. El gen no3-MI-H se construyó uniendo IgG1-LALA-N297A-CH cadena abajo de H54-VH. El gen no3-MI-L se construyó uniendo IgG1-CL cadena abajo de L28-VL. El gen no3-Ghh-L se construyó uniendo IgG1-CLr cadena abajo de Hu22-VH.

10 El gen no5-MI-H se construyó uniendo IgG1-LALA-N297A-s3-CH cadena abajo de H54-VH. El gen no5-Gh-H se construyó uniendo IgG1-LALA-N297A-G3s3-CHr cadena abajo de GC33-VL.

15 El gen no6-MI-H se construyó uniendo IgG1-LALA-N297A-s3-CH cadena abajo de H54-VH-Q39K. El gen no6-MI-L se construyó uniendo IgG1-CL cadena abajo de L28-VL-Q38E. El gen no6-Gh-H se construyó uniendo IgG1-LALA-N297A-G3s3-CHr cadena abajo de GC33-VL-Q38E. El gen no6-Ghh-L se construyó uniendo IgG1-CLr cadena abajo de Hu22-VH-Q39K.

20 Los genes correspondientes (no1-Mh-H, no1-Mh-L, no1-Gh-H, no1-Gh-L, no2-Gh-H, no2-Gh-L, no3-MI-H, no3-MI-L, no3-Ghh-L, no5-MI-H, no5-Gh-H, no6-MI-H, no6-MI-L, no6-Gh-H y no6-Ghh-L) se insertaron en vectores de expresión de células animales.

25 Las siguientes combinaciones de vectores de expresión se introdujeron en células FreeStyle293-F para expresar transitoriamente cada molécula diseñada.

A. Molécula diseñada: no1 (Fig. 11)

Descripción: anticuerpo biespecífico anti-receptor de IL-6 /anti-GPC3 natural.

30 Polipéptidos codificados por polinucleótidos insertados en el vector de expresión: no1-Mh-H (SEQ ID NO: 53), no1-Mh-L (SEQ ID NO: 54), no1-Gh-H (SEQ ID NO: 55) y no1-Gh-L (SEQ ID NO: 56).

B. Molécula diseñada: no2 (Fig. 12)

35 Descripción: construida a partir de no1 intercambiando los dominios VH y VL del anticuerpo anti-GPC3. Polipéptidos codificados por polinucleótidos insertados en el vector de expresión: no1-Mh-H, no1-Mh-L, no2-Gh-H (SEQ ID NO: 57) y no2-Gh-L (SEQ ID NO: 58).

C. Molécula diseñada: no3 (Fig. 13)

40 Descripción: construida a partir de no2 mediante la introducción de modificaciones en cada cadena para alterar su punto isoeléctrico. Polipéptidos codificados por polinucleótidos insertados en el vector de expresión: no3-MI-H (SEQ ID NO: 59), no3-MI-L (SEQ ID NO: 60) y no2-Gh-H y no3-Ghh-L (SEQ ID NO: 61).

45 D. Molécula diseñada: no5 (Fig. 14)

Descripción: construida a partir de no3 mediante la introducción de una modificación para potenciar la asociación de la cadena H heteromérica y una modificación que permite la purificación de anticuerpos basada en la proteína A generada a través de la asociación heteromérica. Polipéptidos codificados por polinucleótidos insertados en el vector de expresión: no5-MI-H (SEQ ID NO: 62), no3-MI-L, no5-Gh-H (SEQ ID NO: 63) y no3-Ghh-L.

E. Molécula diseñada: no6 (Fig. 15)

55 Descripción: construida a partir de no5 mediante la introducción de una modificación para mejorar la asociación entre una cadena de interés H y una cadena de interés L.

Polipéptidos codificados por polinucleótidos insertados en el vector de expresión: no6-MI-H (SEQ ID NO: 64), no6-MI-L (SEQ ID NO: 65), no6-Gh-H (SEQ ID NO: 66) y no6-Ghh-L (SEQ ID NO: 67).

60 Los sobrenadantes de cultivo filtrados a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 µm se cargaron en la resina rProtein A Sepharose de flujo rápido (GE Healthcare) equilibrada con el medio. La resina se eluyó de manera discontinua para purificar las moléculas. Debido a que la proteína G se une al dominio Fab de un anticuerpo, todas las especies de anticuerpos en CM se pueden purificar con proteína G independientemente de la afinidad por la proteína A.

65 Los anticuerpos diseñados (no1, no2, no3, no5 y no6) se evaluaron para determinar su expresión por cromatografía de intercambio catiónico (IEC, por sus siglas en inglés) usando una columna ProPac WCX-10 (Dionex), una columna

analítica. La cromatografía de intercambio catiónico se realizó a un caudal de 0,5 ml/min con un gradiente adecuado utilizando la fase móvil A (MES-NaOH 20 mM, pH 6,1) y la fase móvil B (MES-NaOH 20 mM, NaCl 250 mM, pH 6,1). El resultado de la evaluación por IEC de cada anticuerpo se muestra en la figura 16. El anticuerpo biespecífico anti-receptor de IL-6/anti-GPC3 no1 dio varios picos en estrecha proximidad entre sí. Fue imposible determinar qué pico corresponde al anticuerpo biespecífico de interés. Lo mismo se aplica al no2 que es el resultado del intercambio del dominio VH y el dominio VL del anticuerpo anti-GPC3 en el no1. El pico para el anticuerpo biespecífico de interés podría aislarse por primera vez en no3, que se modificó a partir de no2 introduciendo una modificación para alterar el punto isoeléctrico de cada cadena de no2. La proporción del pico correspondiente al anticuerpo biespecífico de interés aumentó significativamente en no5, que se construyó a partir de no3 mediante la introducción de una modificación para potenciar la asociación heteromérica de la cadena H y una modificación que permite la purificación basada en proteína A del anticuerpo generado a través de asociación heteromérica. La proporción del pico correspondiente al anticuerpo biespecífico de interés aumentó adicionalmente en el no6 que se construyó a partir del no5 mediante la introducción de una modificación que potencia la asociación entre la cadena H y la cadena L de interés.

Después, los presentes inventores evaluaron si el anticuerpo biespecífico de interés podría purificarse a partir de CM de no6 a alta pureza usando una columna de purificación. Las muestras de CM se filtraron a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 µm y se cargaron en una columna HP de proteína A HiTrap (GE Healthcare) equilibrada con D-PBS. La columna se sometió secuencialmente a lavados 1 y 2 y elución con un gradiente de pH usando elución A y B como se muestra en la Tabla 18. El gradiente de pH durante la elución se logró con el siguiente gradiente lineal: elución A/elución B = (100:0) → (35:65) durante 40 minutos.

[Tabla 18]

Equilibrado	D-PBS
Lavado 1	D-PBS
Lavado 2	Citrato de sodio 20 mM, pH 5,0
Elución A	Citrato de sodio 20 mM, pH 5,0
Elución B	Citrato de sodio 20 mM, pH 2,7

El resultado de la elución con gradiente de pH de No6 se muestra en la Fig. 17. El anticuerpo homomérico que tenía la cadena H del anticuerpo anti-GPC3 que era incapaz de unirse a la proteína A pasó a través de la proteína A; el primer pico de elución correspondía al anticuerpo heteromérico que tenía la cadena H del anticuerpo anti-GPC3 y la cadena H de el anticuerpo anti-receptor de IL-6; y el segundo pico de elución correspondía al anticuerpo homomérico que tiene las cadenas H del anticuerpo anti-receptor de IL-6. Por lo tanto, los presentes inventores demostraron que al sustituir Arg por His en la posición 435 (numeración EU), el anticuerpo heteromérico que tiene la cadena H del anticuerpo anti-GPC3 y la cadena H del anticuerpo anti-receptor de IL-6 podría purificarse mediante la etapa de purificación basada en proteína A sola.

La primera fracción de elución se cargó en una columna HiTrap SP Sepharose HP (GE Healthcare) equilibrada con tampón de acetato de sodio 20 mM (pH 5,5). Después de lavar con el mismo tampón, la columna se eluyó con un gradiente de concentración de NaCl de 0 a 500 mM. El pico principal resultante se analizó por cromatografía de intercambio catiónico de la misma manera como se ha descrito anteriormente. El resultado se muestra en la Fig. 18. Se demostró que el anticuerpo biespecífico de interés se purificó a una pureza muy alta.

#### Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona métodos eficaces basados en la alteración de la capacidad de unión a proteína A, para producir o purificar a una alta pureza, multímeros polipeptídicos (anticuerpos multiespecíficos) que tienen la actividad de unión a dos o más tipos de antígenos a través de la etapa de purificación basada en la proteína A sola. Mediante el uso de los métodos de la presente invención, los multímeros polipeptídicos de interés pueden producirse o purificarse eficazmente a una alta pureza sin pérdida de otros efectos producidos por mutaciones de aminoácidos de interés. En particular, cuando los métodos se combinan con un método para controlar la asociación entre dos tipos de dominios de proteínas, los multímeros polipeptídicos de interés pueden producirse o purificarse de manera más eficaz a una mayor pureza.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Método de modificación de polipéptidos para purificar polipéptidos multiméricos

<130> C1-A0916P

ES 2 777 901 T3

<150> JP 2009-294391  
<151> 25/12/2009

5

<160> 67  
<170> PatentIn versión 3.4

10

<210> 1  
<211> 123  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 1

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

15

<210> 2  
<211> 123  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 2

20

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

25



ES 2 777 901 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Tyr  
 20 25 30

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

Ser Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gln Ser Thr Tyr Tyr Arg Arg Glu Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe 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 Arg Ala Gly His Asn Tyr Gly Ala Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

- <210> 3
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 3

5

ES 2 777 901 T3

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

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

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Thr Arg Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Glu Glu Phe  
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Met Thr Ile Asp Lys Ser Thr Gly Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Arg Ser Tyr Gly Tyr Tyr His Asp Glu Trp Gly Glu Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

5 <210> 4  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 4

ES 2 777 901 T3

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

<210> 5  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
 20 25 30  
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

10

ES 2 777 901 T3

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

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

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

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

- 5 <210> 6
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 6

ES 2 777 901 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Arg Asn Ile Glu Arg Asn  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Glu Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ser Ala Ser Arg Lys Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Pro Pro Leu  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly 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> 7  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 7

ES 2 777 901 T3

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

5 <210> 8  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 8

ES 2 777 901 T3

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

5 <210> 9  
 <211> 325  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>

ES 2 777 901 T3

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 9

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

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



ES 2 777 901 T3

		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											
					325										

- <210> 10
- <211> 325
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente
- <400> 10

ES 2 777 901 T3

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

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

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

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

ES 2 777 901 T3

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65 70 75 80  
  
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
  
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110  
  
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125  
  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140  
  
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160  
  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175  
  
 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 Arg Phe Thr Gln Lys Ser  
 305 310 315 320  
  
 Leu Ser Leu Ser Pro

**325**

5 <210> 11  
<211> 325  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
<400> 11

ES 2 777 901 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 777 901 T3

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

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Lys 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  
 325

5 <210> 12  
 <211> 325  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 12

ES 2 777 901 T3

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

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

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

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

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

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

ES 2 777 901 T3

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

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

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

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

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

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 Arg Phe Thr Gln Glu Ser  
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Pro  
 325

<210> 13  
 <211> 325



<212> PRT  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 13

ES 2 777 901 T3

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr 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

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

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

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

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

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
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 Lys Glu Met Thr Lys  
225 230 235 240

ES 2 777 901 T3

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu  
 325

5 <210> 14  
 <211> 325  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 14

ES 2 777 901 T3

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr 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

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

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

ES 2 777 901 T3

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

<210> 15  
 <211> 328  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10

<400> 15

ES 2 777 901 T3

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



ES 2 777 901 T3

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 325

5 <210> 16  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 16

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Tyr  
 20 25 30

Asp Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gln Ser Thr Tyr Tyr Arg Arg Glu Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe 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 Arg Thr Gly Arg Glu Tyr Gly Gly Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

10  
 <210> 17  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 15 <213> Homo sapiens  
 <400> 17



ES 2 777 901 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

Asn Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Thr Arg Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Glu Glu Phe  
50 55 60

Gln Asp Arg Val Ile Met Thr Val Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Lys Ser Tyr Gly Tyr His Leu Asp Glu Trp Gly Glu Gly  
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

- <210> 18
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 18

ES 2 777 901 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Arg Asn Ile Glu Arg Gln  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Glu Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Gln Ala Ser Arg Lys Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Arg Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Pro Pro Leu  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly 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> 19  
 <211> 325  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

5

10

ES 2 777 901 T3

<400> 19

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 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

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

ES 2 777 901 T3

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 Tyr  
 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 Lys Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro  
 325

<210> 20  
 <211> 325  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>

ES 2 777 901 T3

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 20

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 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

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

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

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

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

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 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 Lys Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240

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

ES 2 777 901 T3

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro  
325

5 <210> 21  
<211> 325  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 21

ES 2 777 901 T3

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr 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

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

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

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

ES 2 777 901 T3

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

<210> 22  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 22

5



ES 2 777 901 T3

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser  
 115

- <210> 23
- <211> 219
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 23

ES 2 777 901 T3

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

<210> 24  
 <211> 328  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

ES 2 777 901 T3

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

5

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 777 901 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 325

<210> 25  
 <211> 587  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10

<400> 25

ES 2 777 901 T3

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

ES 2 777 901 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 777 901 T3

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

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

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

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

Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro  
 340 345 350

Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr  
 355 360 365

Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe  
 370 375 380

Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala  
 385 390 395 400

Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr  
 405 410 415

Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr  
 420 425 430

Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val  
 450 455 460

Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu  
 465 470 475 480

Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met  
 485 490 495

Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg  
 500 505 510

Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 515 520 525

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr

ES 2 777 901 T3

530

535

540

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
545 550 555 560

Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr  
565 570 575

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
580 585

<210> 26  
<211> 328  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 26

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



ES 2 777 901 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 325

<210> 27  
 <211> 587  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10

<400> 27

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

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

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

ES 2 777 901 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 777 901 T3

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

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

Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro  
 340 345 350

Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr  
 355 360 365

Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe  
 370 375 380

Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala  
 385 390 395 400

Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr  
 405 410 415

Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr  
 420 425 430

Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val  
 450 455 460

Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu  
 465 470 475 480

Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met  
 485 490 495

Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg  
 500 505 510

Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 515 520 525

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr  
 530 535 540

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 545 550 555 560

Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

ES 2 777 901 T3

565

570

575

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
580 585

5 <210> 28  
<211> 328  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
<400> 28

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 777 901 T3

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

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

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val 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 Arg Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 325

5 <210> 29  
 <211> 230  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 29

ES 2 777 901 T3

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

<210> 30  
 <211> 230  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

ES 2 777 901 T3

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 30

5

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 1 5 10 15

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 65 70 75 80

Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 115 120 125

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Leu Thr  
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 225 230

10

<210> 31  
 <211> 190

ES 2 777 901 T3

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 31

5

Pro Met Pro Phe Ile Ser Ala Lys Ser Ser Pro Val Ile Pro Leu Asp  
 1 5 10 15

Gly Ser Val Lys Ile Gln Cys Gln Ala Ile Arg Glu Ala Tyr Leu Thr  
 20 25 30

Gln Leu Met Ile Ile Lys Asn Ser Thr Tyr Arg Glu Ile Gly Arg Arg  
 35 40 45

Leu Lys Phe Trp Asn Glu Thr Asp Pro Glu Phe Val Ile Asp His Met  
 50 55 60

Asp Ala Asn Lys Ala Gly Arg Tyr Gln Cys Gln Tyr Arg Ile Gly His  
 65 70 75 80

Tyr Arg Phe Arg Tyr Ser Asp Thr Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Leu  
 85 90 95

Tyr Gly Lys Pro Phe Leu Ser Ala Asp Arg Gly Leu Val Leu Met Pro  
 100 105 110

Gly Glu Asn Ile Ser Leu Thr Cys Ser Ser Ala His Ile Pro Phe Asp  
 115 120 125

Arg Phe Ser Leu Ala Lys Glu Gly Glu Leu Ser Leu Pro Gln His Gln  
 130 135 140

Ser Gly Glu His Pro Ala Asn Phe Ser Leu Gly Pro Val Asp Leu Asn  
 145 150 155 160

Val Ser Gly Ile Tyr Arg Cys Tyr Gly Trp Tyr Asn Arg Ser Pro Tyr  
 165 170 175

Leu Trp Ser Phe Pro Ser Asn Ala Leu Glu Leu Val Val Thr  
 180 185 190

10 <210> 32  
 <211> 221  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 32



ES 2 777 901 T3

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

5 <210> 33  
 <211> 221  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>

ES 2 777 901 T3

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 33

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

5

<210> 34

<211> 221

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

ES 2 777 901 T3

<400> 34

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

ES 2 777 901 T3

<210> 35  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 35

10

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser  
 20

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

15

<400> 36

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

20

<210> 37  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25

ES 2 777 901 T3

<400> 37

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

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

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

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe  
50 55 60

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

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

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

Val Ser Ser  
115

5

<210> 38  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

10

<400> 38

ES 2 777 901 T3

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 Tyr Ser Ile Ser Asp Asp  
 20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala 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> 39  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 39

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

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

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

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

10

ES 2 777 901 T3

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

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

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

Val Ser Ser  
115

<210> 40  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Una secuencia peptídica sintetizada 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 Tyr Ser Ile Ser Asp Asp  
20 25 30

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala 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> 41  
<211> 115  
<212> PRT  
<213> Artificial

ES 2 777 901 T3

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 41

5

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

<210> 42

<211> 328

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

15

<400> 42

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



ES 2 777 901 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 777 901 T3

<210> 43  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 777 901 T3

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

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

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

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

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

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

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 325 330

- 5 <210> 44
- <211> 328
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> Una secuencia peptídica sintetizada 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

ES 2 777 901 T3

			100					105						110			
Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro		
		115					120					125					
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys		
	130					135					140						
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp		
145					150					155					160		
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu		
				165					170					175			
Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu		
			180					185					190				
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn		
		195					200					205					
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly		
	210					215					220						
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu		
225					230					235					240		
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr		
				245					250					255			
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> 330  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>

ES 2 777 901 T3

<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly



ES 2 777 901 T3

<400> 47

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

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

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

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

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

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

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

- 5 <210> 48
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

10 <400> 48

ES 2 777 901 T3

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 Gln Asp Ile Ser Ser Tyr  
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 Glu 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 Glu Ala  
65 70 75 80

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

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

<210> 49  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10

<400> 49



ES 2 777 901 T3

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 Gln Asp Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

Tyr Tyr Gly Ser Glu 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 Glu Ala  
 65 70 75 80

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

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

<210> 50  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10

<400> 50

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

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

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

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

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

ES 2 777 901 T3

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

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

5 <210> 51  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 51

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

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

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

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

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

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

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

15 <210> 52  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

20 <400> 52

ES 2 777 901 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 53  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10

<400> 53

ES 2 777 901 T3

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg  
 20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile  
 35 40 45

Thr Ser Asp His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly  
 50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn  
 65 70 75 80

Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn  
 85 90 95

Gln Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val  
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp  
 115 120 125

Gly Gln Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
 145 150 155 160

ES 2 777 901 T3

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala  
245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr  
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
405 410 415

ES 2 777 901 T3

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
450 455 460

Ser Pro  
465

5 <210> 54  
<211> 233  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
<400> 54

ES 2 777 901 T3

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

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala  
 20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile  
 35 40 45

Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys  
 50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg  
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser  
 85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr  
 100 105 110

Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
 130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
 145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr  
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His  
 195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
 210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 55  
 <211> 462

ES 2 777 901 T3

<212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 5 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 55

```

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1          5          10          15

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

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

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

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

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

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

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

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



ES 2 777 901 T3

130 135 140

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 165 170 175

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 180 185 190

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 195 200 205

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 210 215 220

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 225 230 235 240

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser  
 245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 275 280 285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 305 310 315 320

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 325 330 335

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 340 345 350

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 385 390 395 400

ES 2 777 901 T3

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
450 455 460

5 <210> 56  
<211> 239  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 56

ES 2 777 901 T3

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser  
1 5 10 15

Gly Ser Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro  
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser  
35 40 45

Leu Val His Ser Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys  
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe  
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr  
100 105 110

Cys Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys  
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu  
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp  
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp  
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys  
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln  
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230 235

ES 2 777 901 T3

<210> 57  
 <211> 462  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10

<400> 57

```

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
 1           5           10           15

Gly Ser Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 20           25           30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35           40           45

Leu Val His Ser Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys
 50           55           60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 65           70           75           80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85           90           95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100          105          110

Cys Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 115          120          125
    
```

ES 2 777 901 T3

Leu Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 130 135 140

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 165 170 175

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 180 185 190

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 195 200 205

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 210 215 220

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 225 230 235 240

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser  
 245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 275 280 285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 305 310 315 320

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 325 330 335

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 340 345 350

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser



ES 2 777 901 T3

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile  
 130 135 140

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val  
 145 150 155 160

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys  
 165 170 175

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu  
 180 185 190

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu  
 195 200 205

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr  
 210 215 220

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu  
 225 230 235 240

Cys

ES 2 777 901 T3

<211> 466  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 59

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

10



ES 2 777 901 T3

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp  
 115 120 125

Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
 145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
 210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
 225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala  
 245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr  
 305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 355 360 365

ES 2 777 901 T3

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
 370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 450 455 460

Ser Pro  
 465

<210> 60  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10

<400> 60

ES 2 777 901 T3

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

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala  
 20 25 30

Ser Val Gly Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile  
 35 40 45

Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu  
 50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg  
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser  
 85 90 95

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

Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr  
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
 130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
 145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr  
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His  
 195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
 210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 61  
 <211> 241

ES 2 777 901 T3

<212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 5 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 61

```

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1          5          10          15

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

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

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

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

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

ES 2 777 901 T3

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile  
 130 135 140

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val  
 145 150 155 160

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys  
 165 170 175

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu  
 180 185 190

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu  
 195 200 205

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr  
 210 215 220

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu  
 225 230 235 240

Cys

<210> 62  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10

<400> 62

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

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

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile  
 35 40 45

Ser Asp Asp Gln Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly

ES 2 777 901 T3

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

ES 2 777 901 T3

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
 370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu  
 450 455 460

Ser Pro  
 465

5 <210> 63  
 <211> 462  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 63

ES 2 777 901 T3

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser  
1 5 10 15

Gly Ser Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro  
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser  
35 40 45

Leu Val His Ser Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys



ES 2 777 901 T3

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

ES 2 777 901 T3

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 325 330 335

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 340 345 350

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Lys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
 405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 435 440 445

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 450 455 460

<210> 64  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10

<400> 64

ES 2 777 901 T3

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

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

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile  
35 40 45

Ser Asp Asp Gln Ala Trp Ser Trp Val Arg Lys Pro Pro Gly Glu Gly  
50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn

ES 2 777 901 T3

65                                      70                                      75                                      80

Pro Ser Leu Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn  
85                                      90                                      95

Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala  
100                                      105                                      110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp  
115                                      120                                      125

Gly Glu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
130                                      135                                      140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
145                                      150                                      155                                      160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
165                                      170                                      175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
180                                      185                                      190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
195                                      200                                      205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
210                                      215                                      220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
225                                      230                                      235                                      240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala  
245                                      250                                      255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
260                                      265                                      270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
275                                      280                                      285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
290                                      295                                      300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr  
305                                      310                                      315                                      320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
325                                      330                                      335

ES 2 777 901 T3

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
 370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu  
 450 455 460

Ser Pro  
 465

5 <210> 65  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 65

ES 2 777 901 T3

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

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala  
 20 25 30

Ser Val Gly Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile  
 35 40 45

Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu  
 50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Tyr Gly Ser Glu Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg  
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser  
 85 90 95

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

Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr  
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
 130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
 145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr  
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His  
 195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
 210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

ES 2 777 901 T3

<210> 66  
<211> 462  
<212> PRT  
<213> Artificial

5

<220>  
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

10

<400> 66

Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser  
1 5 10 15

Gly Ser Ser Gly Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro  
20 25 30

Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser  
35 40 45

ES 2 777 901 T3

Leu Val His Ser Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Glu Lys  
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe  
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
 85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr  
 100 105 110

Cys Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys  
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 130 135 140

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 165 170 175

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 180 185 190

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 195 200 205

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 210 215 220

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 225 230 235 240

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser  
 245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 275 280 285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val



# ES 2 777 901 T3

```

305                    310                    315                    320

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
                  325                    330                    335

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
                  340                    345                    350

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
                  355                    360                    365

Pro Pro Ser Arg Lys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
   370                    375                    380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
385                    390                    395                    400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
                  405                    410                    415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
                  420                    425                    430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
                  435                    440                    445

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
   450                    455                    460
  
```

5 <210> 67  
 <211> 241  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente  
 <400> 67

ES 2 777 901 T3

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile  
130 135 140

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val  
145 150 155 160

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys  
165 170 175

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu  
180 185 190

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu  
195 200 205

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr  
210 215 220

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu  
225 230 235 240

Cys

## REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un multímero polipeptídico que comprende un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, que comprende las etapas de:

- (a) expresar un ADN que codifica el primer polipéptido y un ADN que codifica el segundo polipéptido; y  
 (b) recoger el producto de expresión de la etapa (a) por cromatografía de afinidad con proteína A, en donde el primer polipéptido y el segundo polipéptido comprenden una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo o una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo;

en donde el dominio Fc de anticuerpo o la región constante de cadena pesada de anticuerpo deriva de IgG humana; en donde el resto de aminoácido en la posición 435, de acuerdo con la numeración EU, en la secuencia de aminoácidos del dominio Fc o de la región constante de cadena pesada es histidina o arginina en el primer polipéptido y arginina o histidina respectivamente en el segundo polipéptido; en donde la combinación de aminoácidos en las posiciones 356 y 439 en la secuencia de aminoácidos de la región Fc o de la región constante de cadena pesada del primer polipéptido se ha modificado a aminoácidos con la misma carga eléctrica; y en donde la combinación de aminoácidos en las posiciones 356 y 439 en la secuencia de aminoácidos de la región Fc o de la región constante de cadena pesada del segundo polipéptido se ha modificado a aminoácidos con una carga eléctrica opuesta a aquella de las posiciones 356 y 439 del primer polipéptido.

2. El método de la reivindicación 1,

- i) en donde la pureza del multímero polipeptídico recogido es del 95 % o más;

y/o

- ii) en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprenden una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de anticuerpo,

particularmente en donde se ha modificado al menos un resto de aminoácido en las secuencias de aminoácidos de FR1, CDR2 y FR3 de la región variable de cadena pesada de anticuerpo;

y/o

- iii) en donde el multímero polipeptídico comprende uno o dos terceros polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno, y la etapa (a) comprende expresar un ADN que codifica el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, particularmente

- a) en donde el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo,

y/o

- b) en donde el multímero polipeptídico comprende adicionalmente un cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, y la etapa (a) comprende expresar un ADN que codifica el cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, especialmente

- b1) en donde al menos uno de los polipéptidos tercero y cuarto que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo,

o

- b2) en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena ligera de anticuerpo y de una región constante de cadena pesada de anticuerpo; el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de anticuerpo; el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de anticuerpo y de una región constante de cadena ligera de anticuerpo; y el cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo;

y/o

- iv) en donde el multímero polipeptídico es un anticuerpo multiespecífico, particularmente en donde el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico.

3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 i) a 2 iv), que comprende el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que no tiene actividad de unión a antígeno, y en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio de unión a antígeno de un receptor y una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo, y el segundo polipéptido que no tiene actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo.

4. Un método para purificar un multímero polipeptídico que comprende un primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y un segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno o que no tiene actividad de unión a antígeno, que comprende las etapas de:

- 5 (a) expresar un ADN que codifica el primer polipéptido y un ADN que codifica el segundo polipéptido; y  
 (b) recoger el producto de expresión de la etapa (a) por cromatografía de afinidad con proteína A, en donde el primer polipéptido y el segundo polipéptido comprenden una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc de anticuerpo o una secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada de anticuerpo;

10 en donde el dominio Fc de anticuerpo o la región constante de cadena pesada de anticuerpo deriva de IgG humana; en donde el resto de aminoácido en la posición 435, de acuerdo con la numeración EU, en la secuencia de aminoácidos del dominio Fc o de la región constante de cadena pesada es histidina o arginina en el primer polipéptido y arginina o histidina respectivamente en el segundo polipéptido; en donde la combinación de aminoácidos en las posiciones 356 y 439 en la secuencia de aminoácidos de la región Fc o de la región constante de cadena pesada del primer polipéptido  
 15 se ha modificado a aminoácidos con la misma carga eléctrica; y en donde la combinación de aminoácidos en las posiciones 356 y 439 en la secuencia de aminoácidos de la región Fc o de la región constante de cadena pesada del segundo polipéptido se ha modificado a aminoácidos con una carga eléctrica opuesta a aquella de las posiciones 356 y 439 del primer polipéptido.

20 5. El método de la reivindicación 4,

i) en donde la pureza del multímero polipeptídico recogido es del 95 % o más;

y/o

25 ii) en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno y el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprenden una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de anticuerpo,

particularmente en donde se ha modificado al menos un resto de aminoácido en las secuencias de aminoácidos de FR1, CDR2 y FR3 de la región variable de cadena pesada de anticuerpo; y/o

30 iii) en donde el multímero polipeptídico comprende uno o dos terceros polipéptidos que tienen una actividad de unión a antígeno, y la etapa (a) comprende expresar un ADN que codifica el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, particularmente

a) en donde el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo,

35 y/o

b) en donde el multímero polipeptídico comprende adicionalmente un cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, y la etapa (a) comprende expresar un ADN que codifica el cuarto polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno, especialmente

40 b1) en donde al menos uno de los polipéptidos tercero y cuarto que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo,

o

45 b2) en donde el primer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena ligera de anticuerpo y de una región constante de cadena pesada de anticuerpo; el segundo polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada de anticuerpo; el tercer polipéptido que tiene una actividad de unión a antígeno comprende secuencias de aminoácidos de una región variable de cadena pesada de anticuerpo y de una región constante de cadena ligera de anticuerpo; y el cuarto polipéptido que  
 50 tiene una actividad de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera de anticuerpo;

y/o

55 iv) en donde el multímero polipeptídico es un anticuerpo multiespecífico, particularmente en donde el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico.

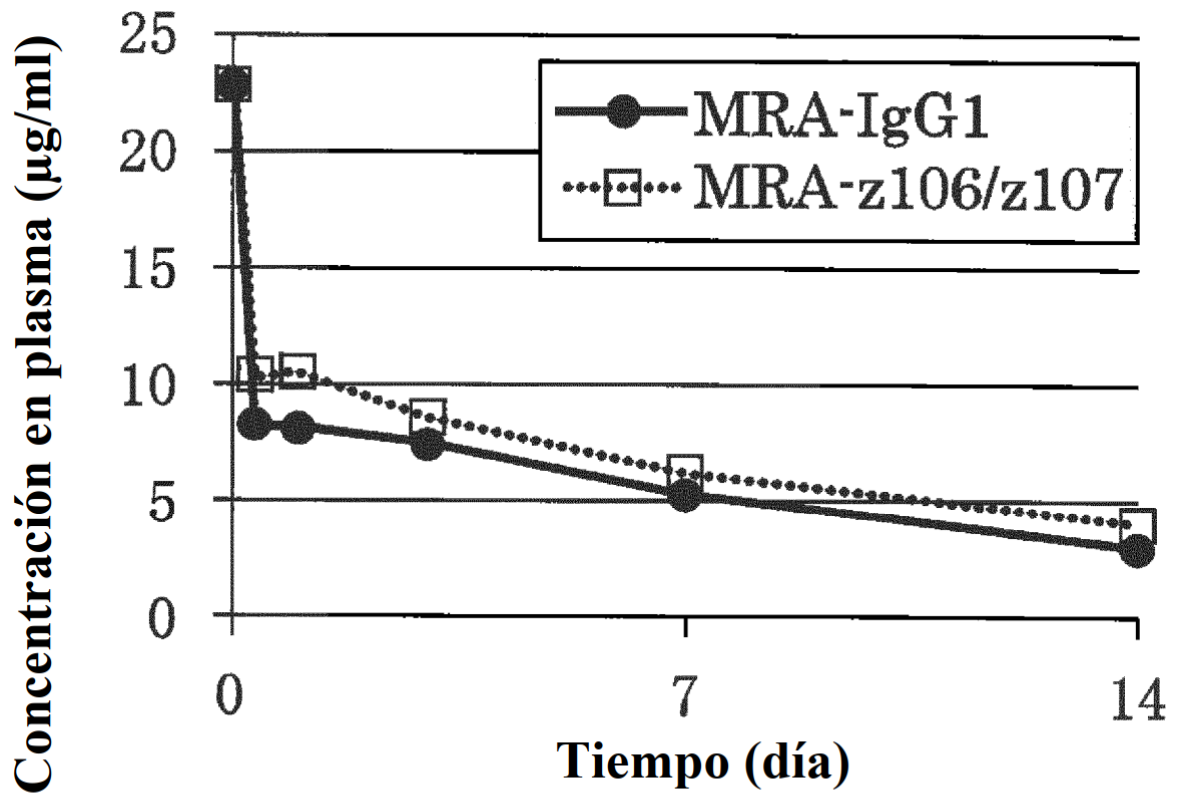


FIG. 1

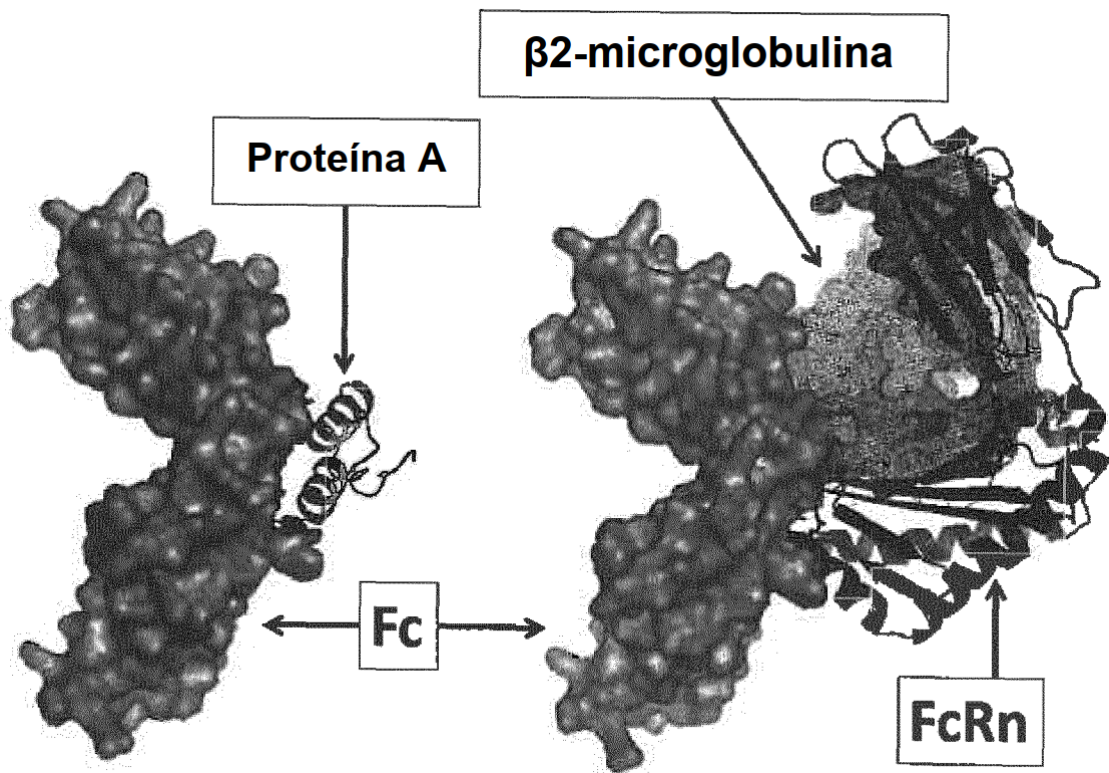


FIG. 2

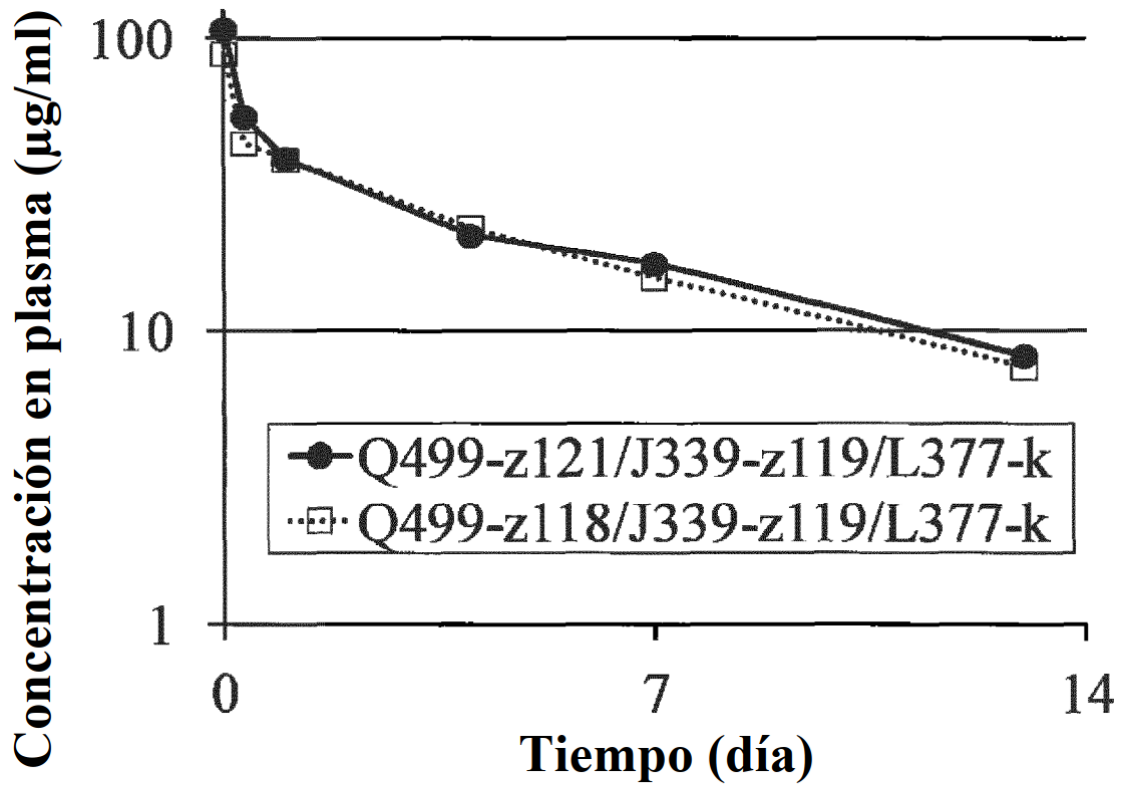
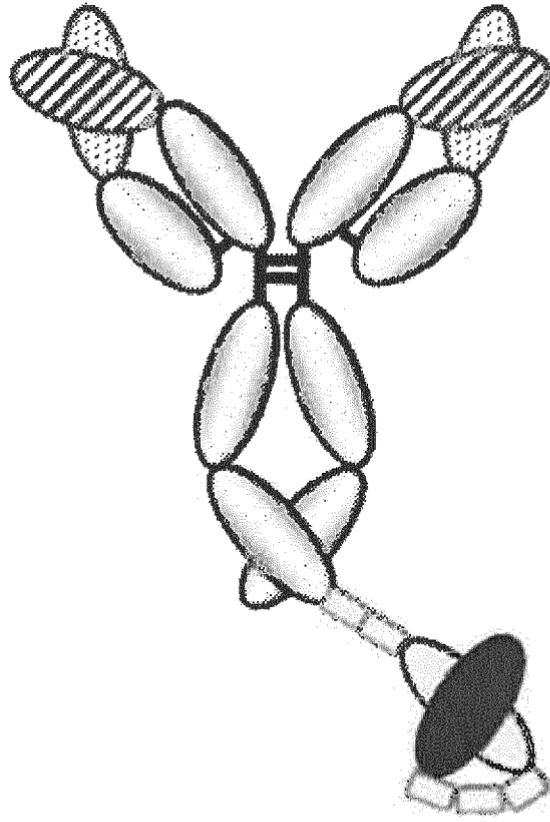


FIG. 3



**FIG. 4**



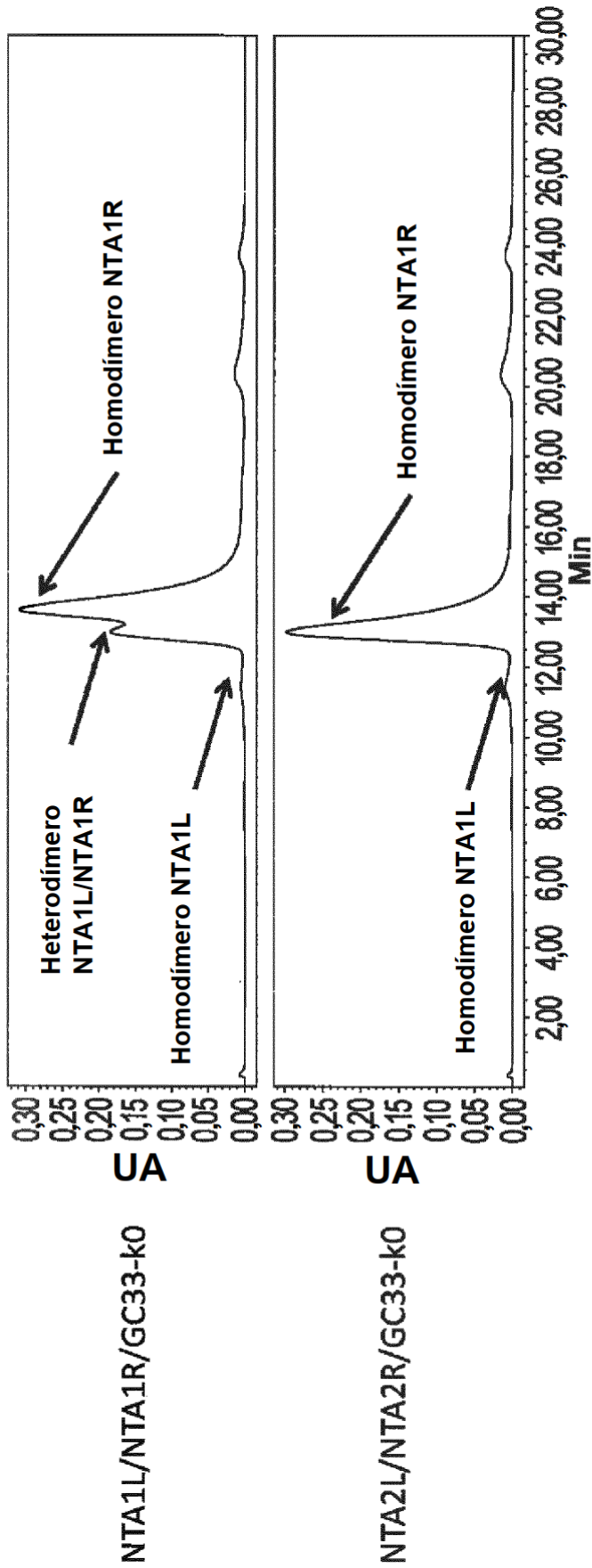
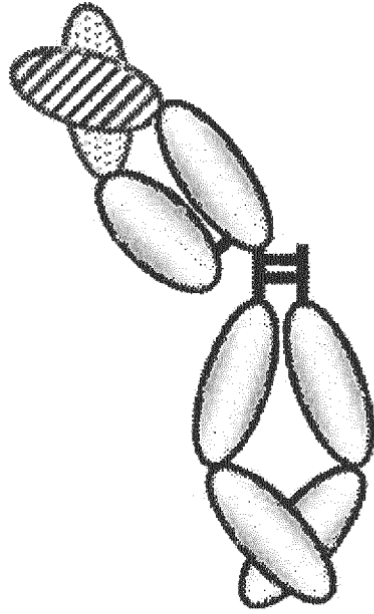


FIG. 5



**FIG. 6**

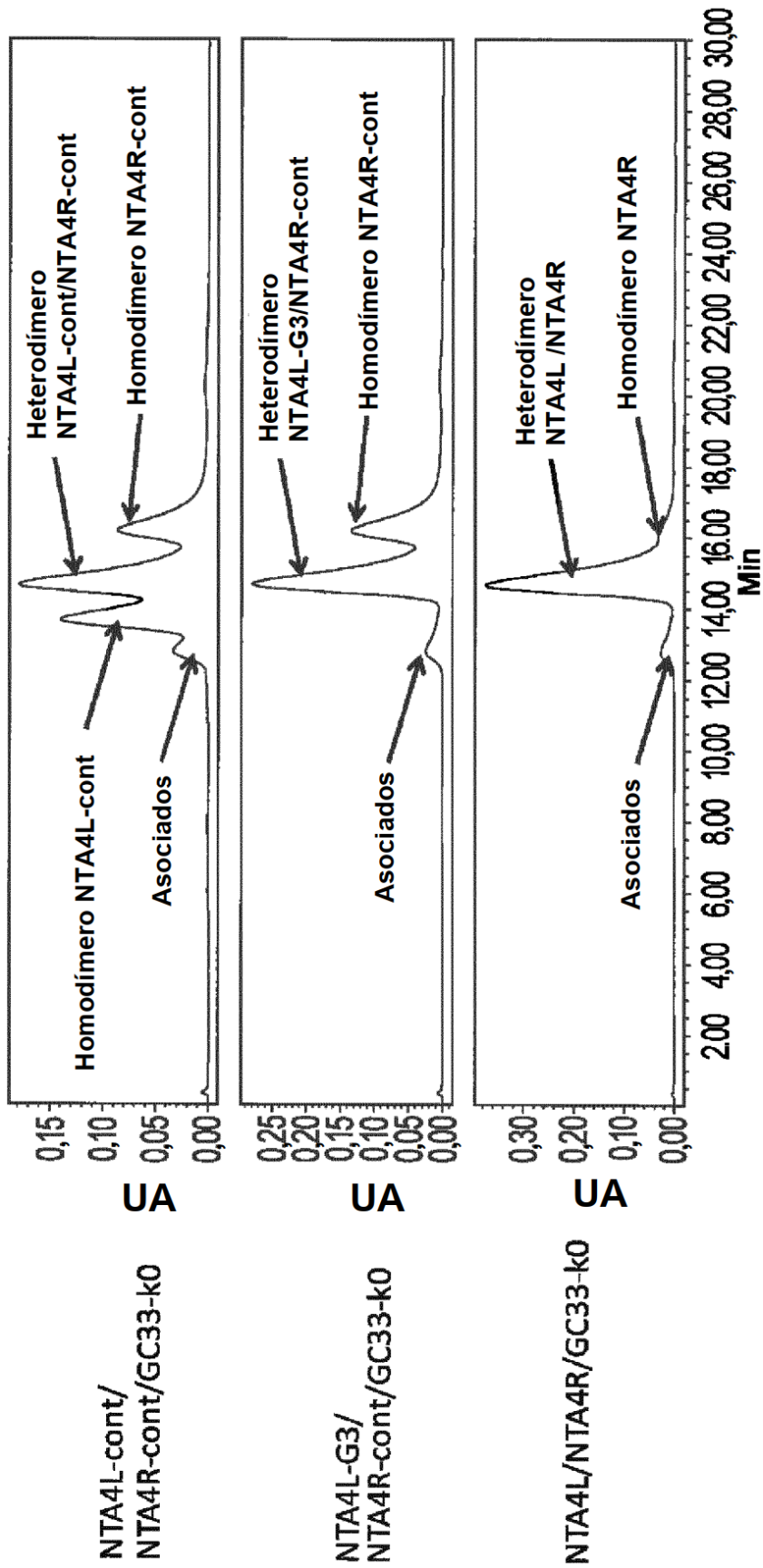


FIG. 7

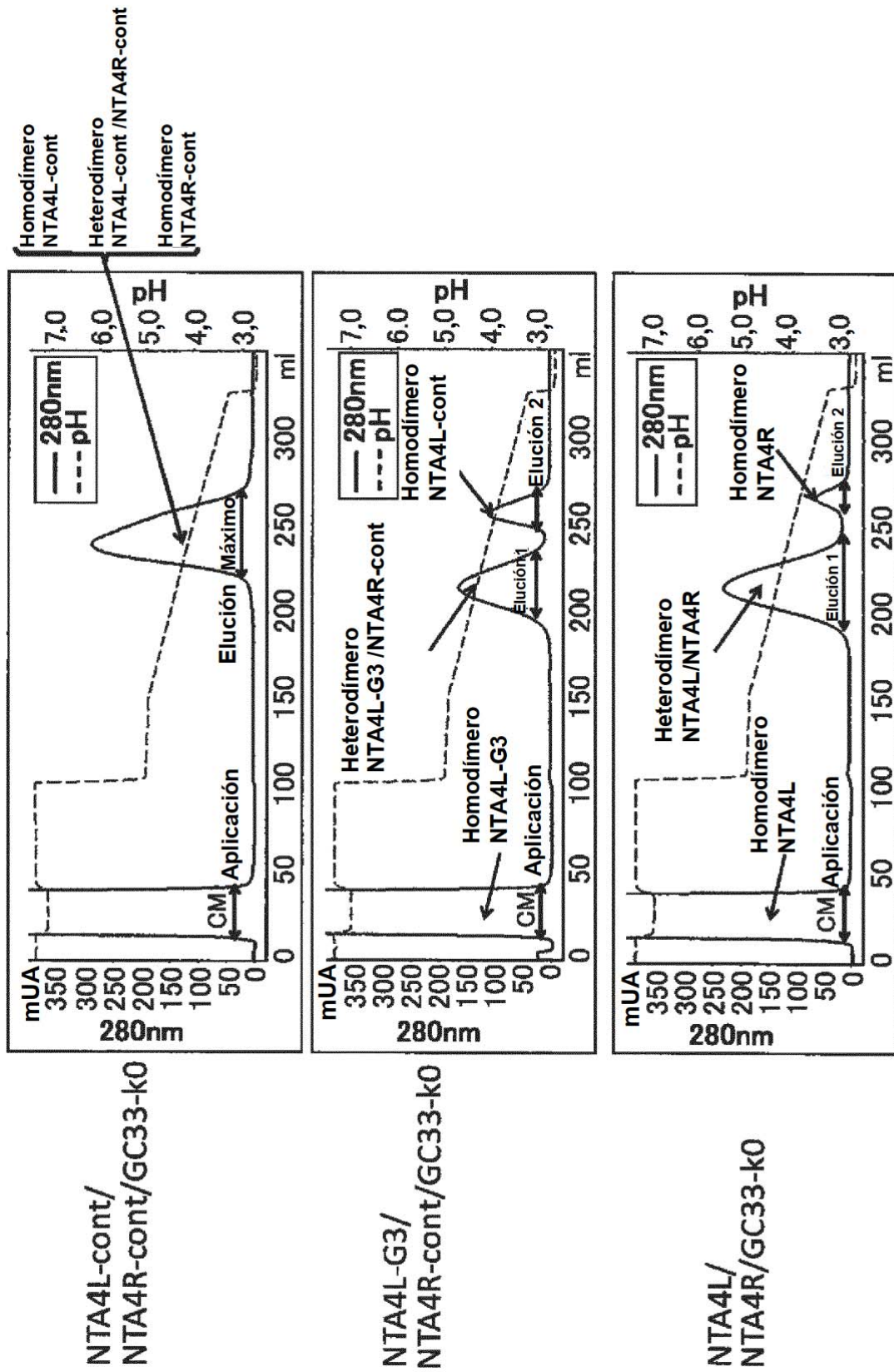
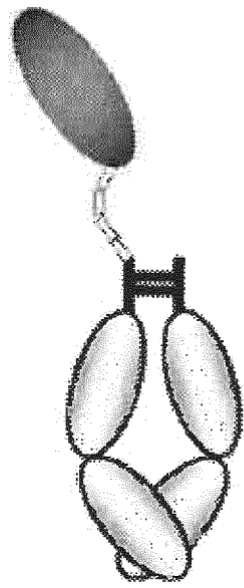


FIG. 8



**FIG. 9**

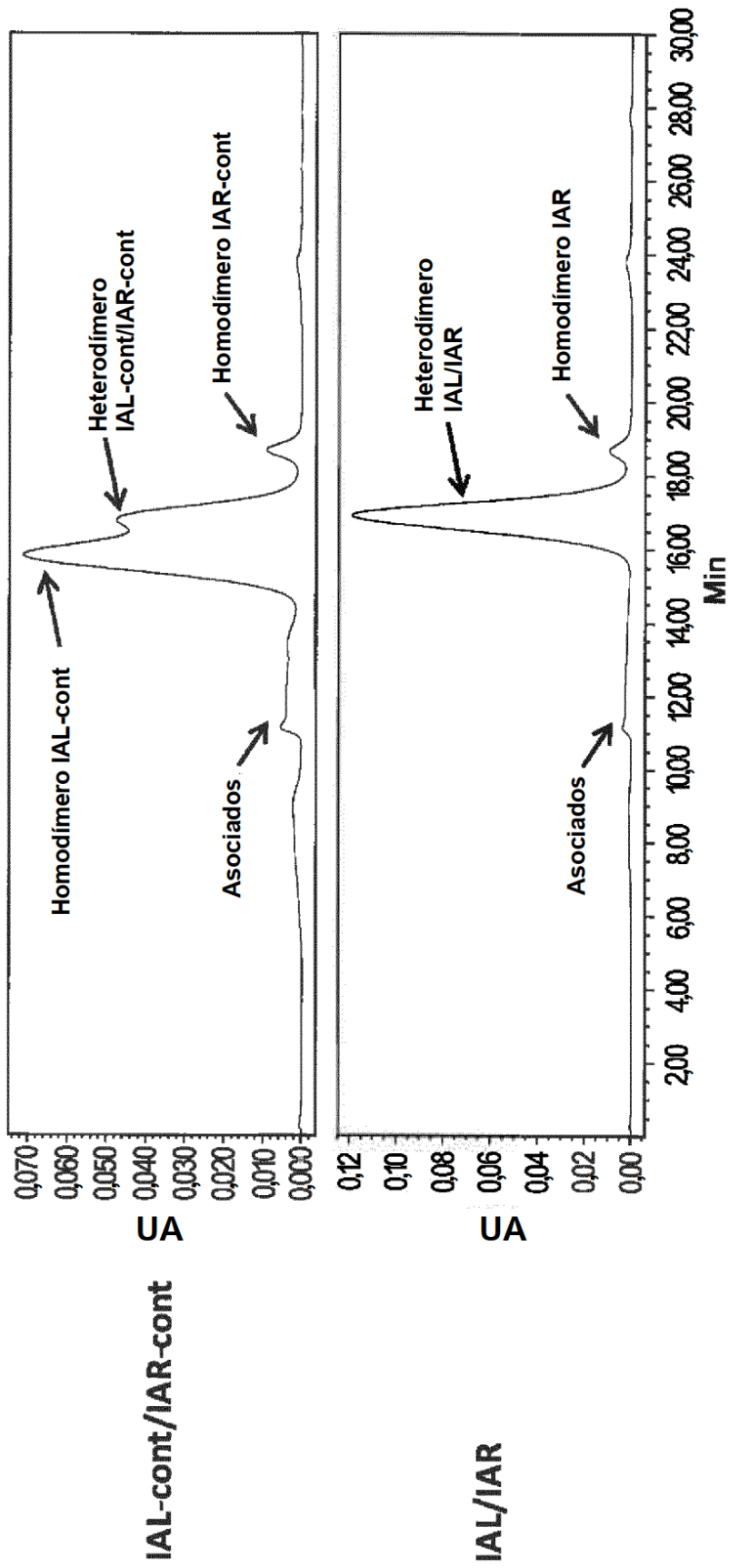
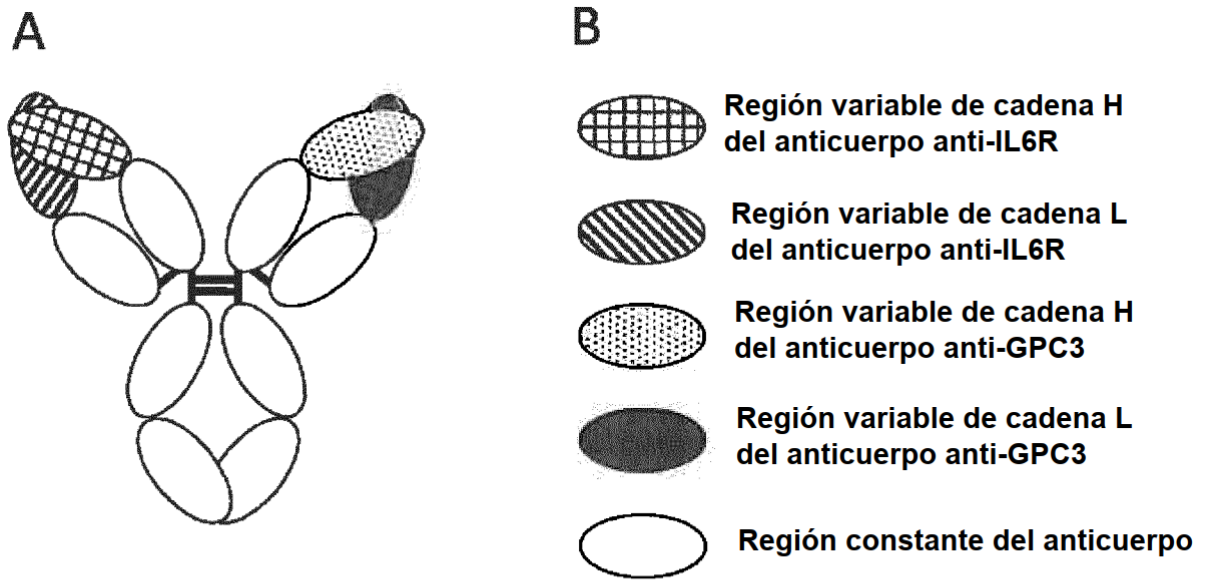
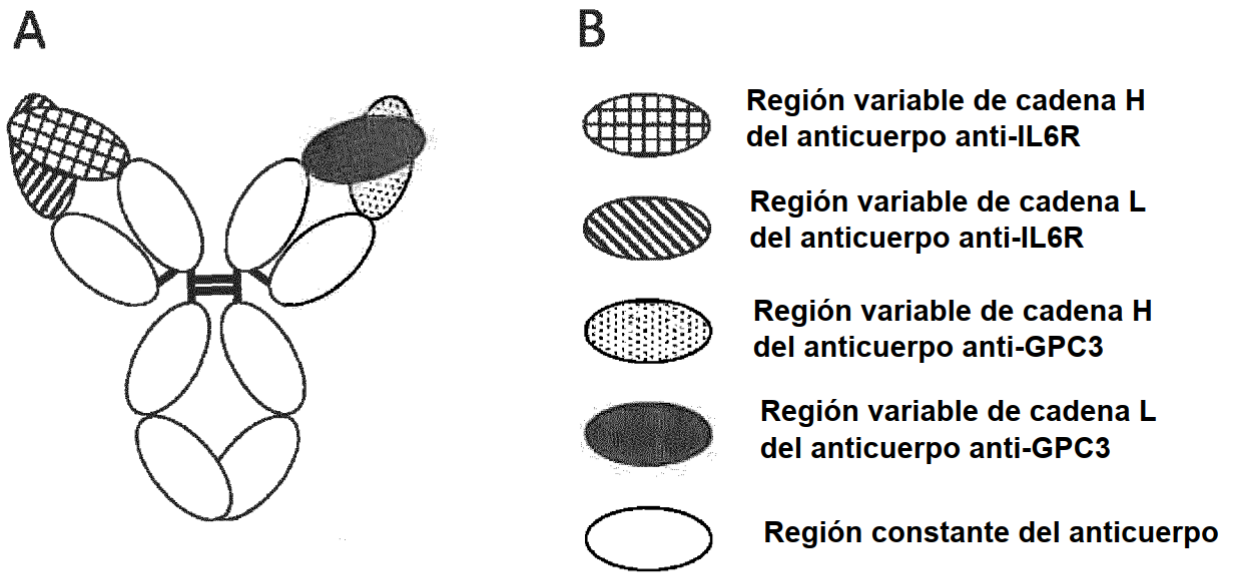


FIG. 10

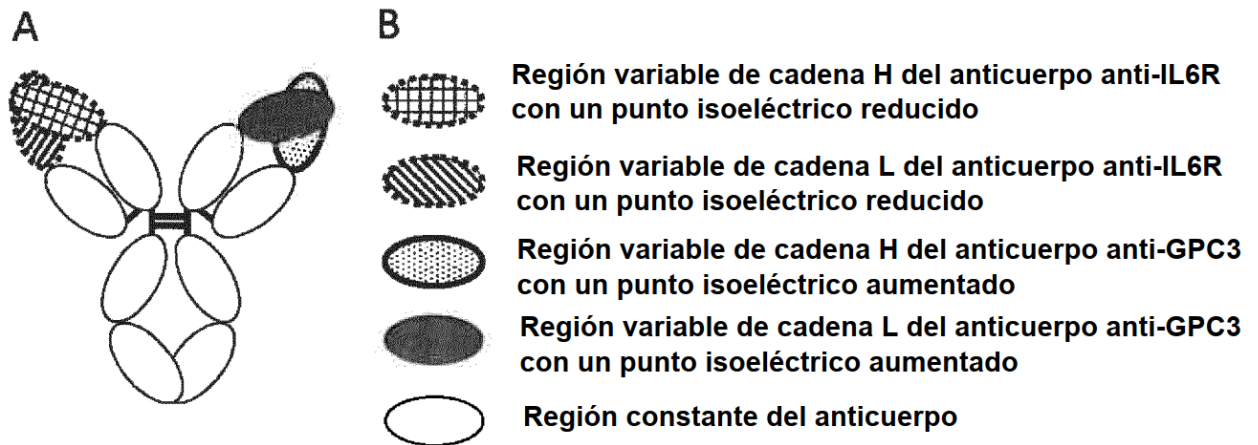


**FIG. 11**

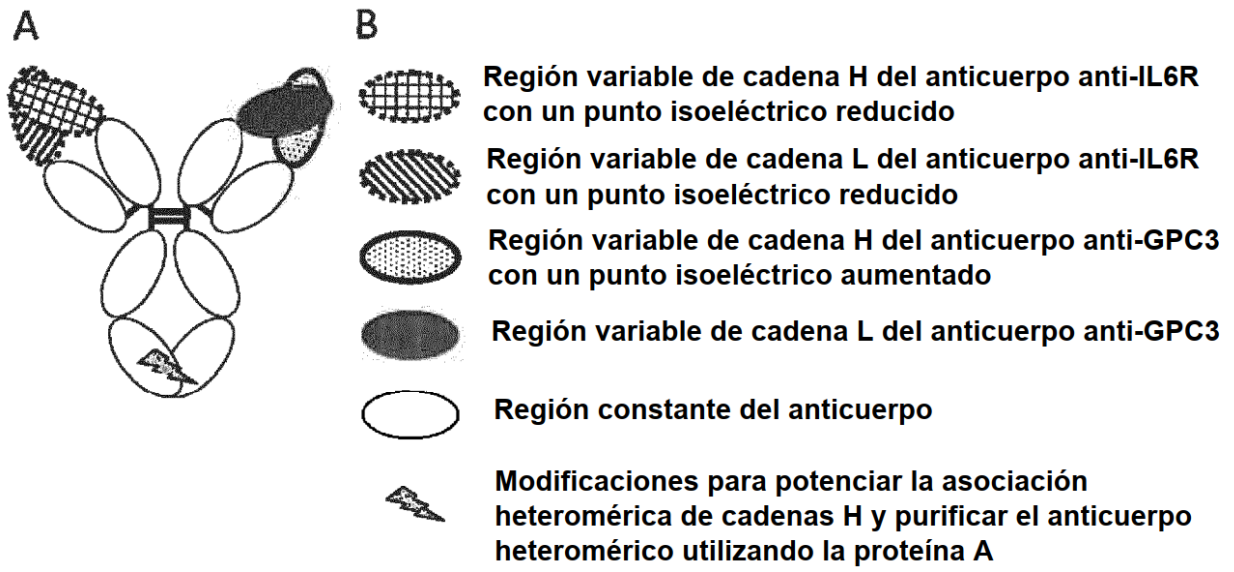


**FIG. 12**

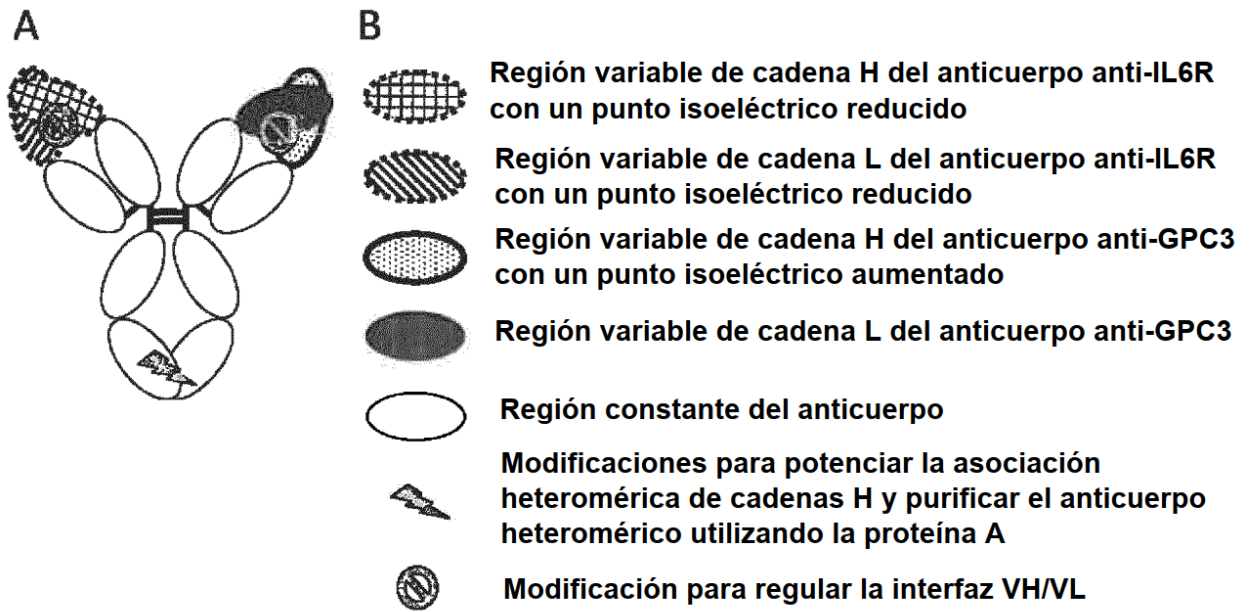




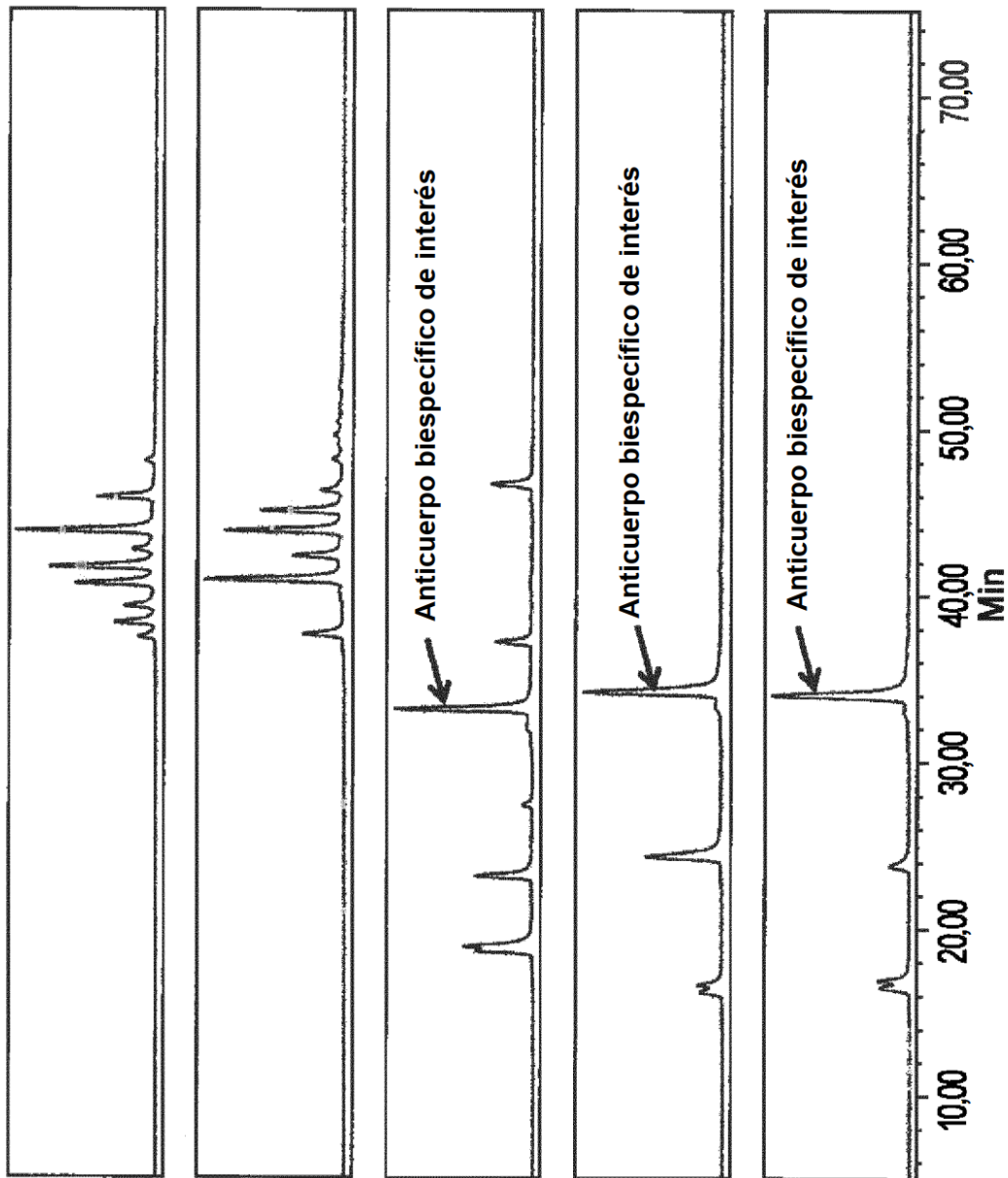
**FIG. 13**



**FIG. 14**



**FIG. 15**



Receptor anti-IL6 natural/anticuerpo biespecifico anti-GPC3



Intercambiar los dominios VH y VL de anticuerpo anti-GPC3



Introducir modificaciones para alterar el punto isoelectrico de cada cadena



Introducir modificaciones para potenciar la asociación heteromérica de la cadena H y purificar el anticuerpo heteromérico utilizando la proteína A



Introducir modificaciones para mejorar la asociación entre la cadena H y la cadena L de interés

FIG. 16

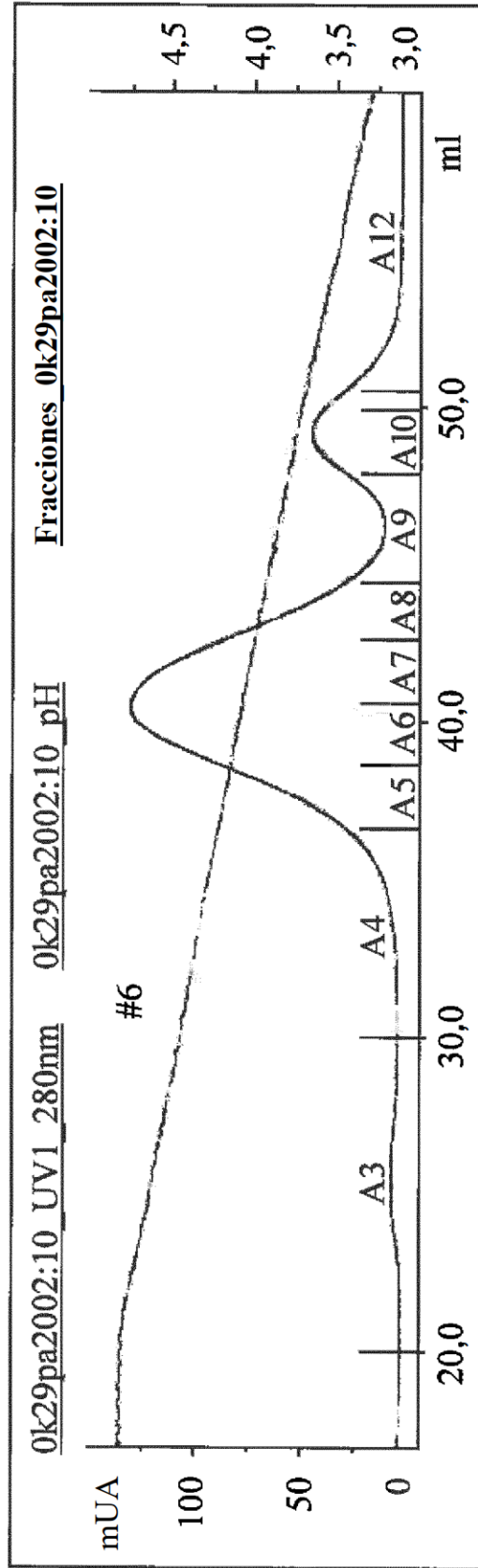


FIG. 17

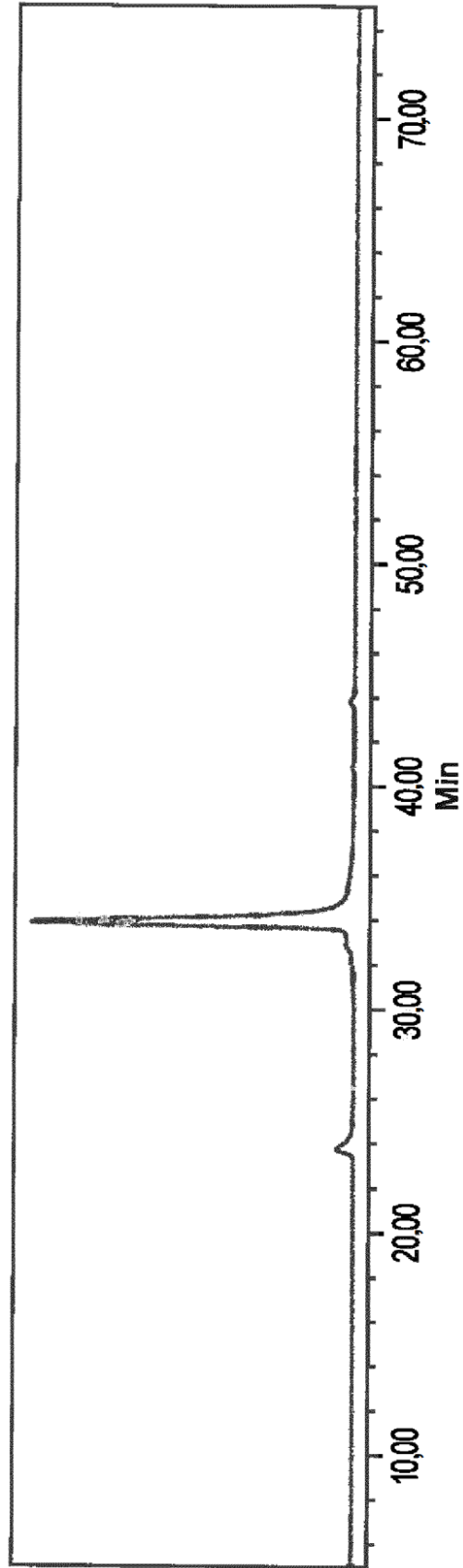


FIG. 18