

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 419**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2013** **PCT/JP2013/054461**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013** **WO13125667**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2013** **E 13751098 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020** **EP 2818183**

54 Título: **Molécula de unión al antígeno que promueve la desaparición del antígeno vía FcγRIIB**

30 Prioridad:

24.02.2012 WO PCT/JP2012/054624

24.08.2012 JP 2012185866

28.09.2012 WO PCT/JP2012/075092

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

23.11.2020

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;

MAEDA, ATSUHIKO;

IWAYANAGI, YUKI;

HARAYA, KENTA;

KATADA, HITOSHI;

KADONO, SHOJIRO y

MIMOTO, FUTA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 795 419 T3

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

DESCRIPCIÓN

Molécula de unión al antígeno que promueve la desaparición del antígeno vía FcγRIIB

Campo técnico

La presente invención describe en general usos de moléculas de unión al antígeno para eliminar antígenos del plasma; métodos para eliminar antígenos del plasma, que comprenden administrar moléculas de unión a antígeno; composiciones farmacéuticas que comprenden moléculas de unión al antígeno que son capaces de eliminar antígenos del plasma; y métodos para producir moléculas de unión al antígeno para eliminar antígenos del plasma. Una molécula de unión al antígeno para usar en un método de tratamiento para eliminar antígeno del plasma, en donde la molécula de unión al antígeno comprende un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones, y una región Fc en la que el aminoácido en la posición 238 es Asp y el aminoácido en la posición 271 es Gly indicado por la numeración EU, caracterizada por tener una actividad de unión a FcγRIIB mejorada en comparación con la región Fc presentada como IgG1 (SEQ ID NO: 14), en donde el dominio de unión al antígeno es una región variable de anticuerpo, y en donde la región Fc es una región Fc de IgG1 humana, en donde la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno que cambia dependiendo de las condiciones de la concentración de iones se define por uno o ambos de los siguientes (a) y (b):

(a) el valor de KD (Ca 3 μM)/KD (Ca 2 mM), que es la relación de la constante de disociación (KD) para un antígeno en unas condiciones de concentración de iones de calcio bajas a la KD en unas condiciones de concentración de iones de calcio altas, es 2 o más; y

(b) el valor de KD (pH5.8)/KD (pH7.4), que es la relación de KD para el antígeno en unas condiciones de intervalo de pH ácido a la KD en unas condiciones de intervalo de pH neutro, es 2 o más.

Antecedentes de la técnica

Los anticuerpos están llamando la atención como productos farmacéuticos, ya que son altamente estables en el plasma y tienen pocos efectos secundarios. En la actualidad, hay una serie de anticuerpos terapéuticos de tipo IgG disponibles en el mercado y muchos anticuerpos terapéuticos están actualmente en desarrollo (documentos no patentes 1 y 2). Mientras tanto, se han descrito diversas tecnologías aplicables a anticuerpos terapéuticos de segunda generación, que incluyen las que mejoran la función efectora, la capacidad de unión al antígeno, farmacocinética y estabilidad, y las que reducen el riesgo de inmunogenicidad (documento no patente 3). En general, la dosis requerida de un anticuerpo terapéutico es muy alta. Esto, a su vez, ha conducido a problemas, tales como un alto coste de producción, así como a la dificultad de producir formulaciones subcutáneas. En teoría, la dosis de un anticuerpo terapéutico se puede reducir mejorando la farmacocinética del anticuerpo o mejorando la afinidad entre anticuerpos y antígenos.

La bibliografía ha descrito métodos para mejorar la farmacocinética de anticuerpos usando la sustitución artificial de aminoácidos en regiones constantes (documentos no patentes 4 y 5). De manera similar, la maduración por afinidad se ha descrito como una tecnología para mejorar la actividad de unión al antígeno y/o la actividad neutralizadora de antígeno de un anticuerpo (documento no patente 6). Esta tecnología permite mejorar la actividad de unión al antígeno mediante la introducción de mutaciones de aminoácidos en la región CDR de una región variable o similar. La mejora de la capacidad de unión al antígeno permite la mejora de la actividad biológica in vitro o la reducción de la dosis, y además permite la mejora de la eficacia in vivo (documento no patente 7).

La capacidad de neutralización de antígeno de una molécula de anticuerpo individual que tiene actividad neutralizante depende de su afinidad. Por lo tanto, la afinidad de los anticuerpos se ha mejorado usando diversos métodos para neutralizar antígenos con una pequeña cantidad de anticuerpos (documento no patente 6). Además, si la afinidad del anticuerpo con el antígeno se pudiera hacer infinita mediante la unión covalente al antígeno, una sola molécula de anticuerpo podría neutralizar una molécula de antígeno (un anticuerpo divalente puede neutralizar dos moléculas de antígeno). Sin embargo, la reacción de neutralización estequiométrica de una molécula de anticuerpo contra una molécula de antígeno (un anticuerpo divalente contra dos antígenos) es el límite de dichos métodos y, por lo tanto, es imposible neutralizar completamente el antígeno con una cantidad de anticuerpo menor que la cantidad de antígeno. Es decir, el efecto de neutralización de antígeno al mejorar la afinidad tiene un límite (documento no patente 8). Para mantener el efecto de neutralización de un anticuerpo neutralizante durante un cierto periodo, el anticuerpo se debe administrar con una dosis mayor que la cantidad de antígenos producidos en el cuerpo durante el mismo periodo. Solo con la mejora de la farmacocinética de los anticuerpos o la tecnología de maduración de la afinidad descrita antes, existe una limitación en la reducción de la dosis de anticuerpo requerida. Por consiguiente, con el fin de mantener el efecto de neutralización de antígeno durante un periodo objetivo con una cantidad de anticuerpo menor que la cantidad de antígeno, un solo anticuerpo debe neutralizar múltiples antígenos. Recientemente se ha descrito una molécula de unión al antígeno que se une a un antígeno de manera dependiente del pH y/o de la concentración de iones metálicos como un método novedoso para lograr el objetivo anterior (documentos de patentes 1 y 2). Las moléculas de unión al antígeno que dependen de la concentración de iones, que se unen fuertemente a un antígeno en condiciones de pH neutro y/o de alta concentración de iones de calcio en el plasma y se disocian del antígeno en condiciones de pH ácido y/o de baja concentración de iones de calcio en el endosoma, se pueden disociar del antígeno en el endosoma. Cuando

una molécula de unión al antígeno dependiente de la concentración de iones se disocia del antígeno es reciclada al plasma por el FcRn, y puede unirse de nuevo a otro antígeno. Por lo tanto, una sola molécula de unión al antígeno dependiente de la concentración de iones se puede unir a una serie de antígenos repetidamente.

Por otro lado, la retención en el plasma de un antígeno es muy corta en comparación con los anticuerpos reciclados a través de la unión a FcRn. Sin embargo, aunque la retención en el plasma del propio antígeno es corta, cuando un anticuerpo típico con una retención plasmática tan larga se une al antígeno, la retención en el plasma del complejo antígeno-anticuerpo se prolonga de manera similar al anticuerpo. Por lo tanto, normalmente, cuando se administra un anticuerpo, el antígeno unido por el anticuerpo existe en forma de un complejo antígeno-anticuerpo, que prolonga la retención en el plasma del antígeno (el antígeno no se elimina fácilmente del plasma) y provoca un aumento de la concentración del antígeno en el plasma. Por otro lado, una molécula de unión al antígeno que depende de la concentración de iones puede suprimir el aumento de la concentración del antígeno en el plasma al disociarse del antígeno en el endosoma. Sin embargo, esta supresión del aumento en la concentración de antígeno en el plasma es afectada por el equilibrio con la cantidad de antígenos producidos in vivo. Por lo tanto, se consideró la posibilidad de que la administración de dichas moléculas de unión al antígeno dependientes de la concentración de iones pudiera elevar la concentración de antígeno en plasma en comparación con la administración anterior (documento de Patente 3).

Recientemente, se han producido moléculas de unión al antígeno que se unen a FcRn en condiciones neutras. La administración de una molécula de unión al antígeno que se une a un antígeno de manera dependiente de la concentración de iones y se une a FcRn en condiciones neutras puso de manifiesto que la molécula puede disminuir la concentración de antígeno en el plasma en comparación con la administración anterior (documento de patente 3). Aunque los anticuerpos típicos aumentan la concentración de antígeno en el plasma cuando se administran, las moléculas de unión al antígeno que tienen actividad de unión a FcRn en condiciones de pH neutro y las moléculas de unión al antígeno que se unen a un antígeno de una manera dependiente de la concentración de iones y que tienen actividad de unión a FcRn en condiciones de pH neutro, pueden disminuir la concentración de antígeno en el plasma cuando se administran. Puesto que dichas moléculas de unión al antígeno pueden eliminar activamente los antígenos del plasma por endocitosis que se produce como resultado de la unión a FcRn, estas moléculas son muy útiles como productos farmacéuticos.

Por otro lado, además de FcRn, existen varios receptores de Fcγ (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIIIa) como receptores para la IgG (documento no patente 9). Puesto que la actividad de unión de los anticuerpos para activar los receptores de Fcγ tiene una función importante en la citotoxicidad de un anticuerpo, se han desarrollado hasta la fecha anticuerpos que se dirigen a antígenos de membrana, cuyas citotoxicidades se han aumentado al aumentar su actividad de unión para activar los receptores de Fcγ, (documentos no patentes 10 y 11). De manera similar, puesto que la actividad de unión al receptor inhibidor de Fcγ (FcγRIIb) tiene una función importante en la actividad de inmunosupresión (documentos no patentes 12, 13 y 14), se están estudiando la actividad agonista (documentos no patentes 15 y 16), y dichos anticuerpos que se dirigen a antígenos de membrana, que tienen una actividad de unión mejorada a los receptores inhibidores de Fcγ (documentos no patentes 17 y 18).

Los efectos de los anticuerpos que se unen a antígenos solubles en la unión de FcγR se han examinado principalmente desde el punto de vista de los efectos secundarios. Por ejemplo, se sabe que el riesgo de tromboembolia aumentó en un grupo de pacientes que recibieron bevacizumab, un anticuerpo contra el VEGF (documento no patente 19). Del mismo modo, se ha observado tromboembolia en ensayos de desarrollo clínico de anticuerpos contra el ligando CD40, y el estudio clínico se suspendió (documento no patente 20). FcγRIIa, un receptor de Fcγ activador, se expresa en las células plaquetarias, mientras que un receptor de Fcγ inhibidor FcγRIIb no es expresado (documento no patente 21), y estudios posteriores que usan modelos animales y similares han sugerido que ambos anticuerpos administrados agregan plaquetas a través de la unión a FcγRIIa en las plaquetas y, como resultado forman coágulos de sangre (documentos no patentes 22 y 23). En pacientes con lupus eritematoso sistémico que es una enfermedad autoinmunitaria, las plaquetas son activadas a través de un mecanismo dependiente de FcγRIIa, y se ha descrito que la activación de plaquetas se correlaciona con la gravedad de los síntomas (documento no patente 24). Además, hay informes de que cuando se usa un anticuerpo con unión a FcγRIIb mejorada como un producto farmacéutico, se puede esperar una disminución en el riesgo de producción de anticuerpos (documento no patente 25), y un anticuerpo que se une a un antígeno de membrana, cuya unión a FcγRIIa se ha mejorado, aumenta la fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) a través de macrófagos y células dendríticas (documento no patente 26). Sin embargo, no se sabía que la actividad de unión hacia los receptores de Fcγ activadores y/o inhibidores de los anticuerpos que se dirigen a antígenos solubles tuviera un efecto en la cinética plasmática de los anticuerpos o antígenos unidos por los anticuerpos en los organismos a los que se administraba los anticuerpos.

Documentos de la técnica anterior

Documentos de patentes

[Documento de patente 1] WO2009/125825

[Documento de patente 2] WO2012/073992

[Documento de patente 3] WO2011/122011

[Documento no patentes]

- [Documento no patente 1] Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden y Matthew C Dewitz, Monoclonal antibody successes in the clinic., *Nat. Biotechnol.* (2005) 23, 1073-1078
- 5 [Documento no patente 2] Pavlou AK, Belsey MJ., The therapeutic antibodies market to 2008., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, (2005) 59 (3), 389-396
- [Documento no patente 3] Kim SJ, Park Y, Hong HJ., Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies., *Mol. Cells*, (2005) 20 (1), 17-29
- [Documento no patente 4] Hinton PR, Xiong JM, Johlfs MG, Tang MT, Keller S, Tsurushita N., An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life., *J. Immunol.* (2006) 176 (1), 346-356
- 10 [Documento no patente 5] Ghetie V, Popov S, Borvak J, Radu C, Matesoi D, Medesan C, Ober RJ, Ward ES., Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis., *Nat. Biotechnol.* (1997) 15 (7), 637-640
- [Documento no patente 6] Rajpal A, Beyaz N, Haber L, Cappuccilli G, Yee H, Bhatt RR, Takeuchi T, Lerner RA, Crea R., A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2005) 102 (24), 8466-8471
- 15 [Documento no patente 7] Wu H, Pfarr DS, Johnson S, Brewah YA, Woods RM, Patel NK, White WI, Young JF, Kiener PA., Development of Motavizumab, an Ultra-potent Antibody for the Prevention of Respiratory Syncytial Virus Infection in the Upper and Lower Respiratory Tract., *J. Mol. Biol.* (2007) 368, 652-665
- [Documento no patente 8] Hanson CV, Nishiyama Y, Paul S., Catalytic antibodies and their applications., *Curr. Opin. Biotechnol.* (2005) 16 (6), 631-636
- 20 [Documento no patente 9] Jefferis R, Lund J., Interaction sites on human IgG-Fc for FcgammaR: current models., *Immunol. Lett.* (2002) 82, 57-65
- [Documento no patente 10] Clynes, R., Yoshizumi, T., Moroi, Y., Houghton, A.N., and Ravetch, J.V., Fc Receptors are required for passive and active immunity to melanoma., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1998) 95, 652-656
- 25 [Documento no patente 11] Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV., Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets., *Nat. Med.* (2000) 6, 443-446
- [Documento no patente 12] Wernersson S, Karlsson MC, Dahlstrom J, Mattsson R, Verbeek JS, Heyman B., IgG-mediated enhancement of antibody responses is low in Fc receptor gamma chain-deficient mice and increased in Fc gamma RII-deficient mice., *J. Immunol.* (1999) 163 (2), 618-622
- 30 [Documento no patente 13] Yuasa T, Kubo S, Yoshino T, Ujike A, Matsumura K, Ono M, Ravetch JV, Takai T., Deletion of fcgamma receptor IIB renders H-2(b) mice susceptible to collagen-induced arthritis., *J. Exp. Med.* (1999) 189 (1), 187-194
- [Documento no patente 14] Nakamura A, Yuasa T, Ujike A, Ono M, Nukiwa T, Ravetch JV, Takai T., Fcgamma receptor IIB-deficient mice develop Goodpasture's syndrome upon immunization with type IV collagen: a novel murine model for autoimmune glomerular basement membrane disease., *J. Exp. Med.* (2000) 191 (5), 899-906
- 35 [Documento no patente 15] Li F, Ravetch JV., Inhibitory Fcy receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies., *Science* (2011) 333 (6045), 1030-1034
- [Documento no patente 16] Wilson NS, Yang B, Yang A, Loeser S, Marsters S, Lawrence D, Li Y, Pitti R, Totpal K, Yee S, Ross S, Vernes JM, Lu Y, Adams C, Offringa R, Kelley B, Hymowitz S, Daniel D, Meng G, Ashkenazi A., An Fcy receptor-dependent mechanism drives antibody-mediated target-receptor signaling in cancer cells., *Cancer Cell* (2011)
- 40 19 (1), 101-113
- [Documento no patente 17] Moore GL, Chen H, Karki S, Lazar GA., Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions., *Mol. Immunol.* (2008) 45, 3926-3933
- [Documento no patente 18] Li F, Ravetch JV., Apoptotic and antitumor activity of death receptor antibodies require inhibitory Fcy receptor engagement., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* (2012) 109 (27), 10966-10971
- 45 [Documento no patente 19] Scappaticci FA, Skillings JR, Holden SN, Gerber HP, Miller K, Kabbinar F, Bergsland E, Ngai J, Holmgren E, Wang J, Hurwitz H., Arterial thromboembolic events in patients with metastatic carcinoma treated with chemotherapy and bevacizumab., *J. Natl. Cancer Inst.* (2007) 99 (16), 1232-1239
- [Documento no patente 20] Boumpas DT, Furie R, Manzi S, Illei GG, Wallace DJ, Balow JE, Vaishnav A, A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis., *Arthritis. Rheum.* (2003) 48 (3), 719-727.
- 50

[Documento no patente 21] Mackay M, Stanevsky A, Wang T, Aranow C, Li M, Koenig S, Ravetch JV, Diamond B., Selective dysregulation of the FcγRIIb receptor on memory B cells in SLE., *J. Exp. Med.* (2006) 203 (9), 2157-2164

[Documento no patente 22] Meyer T, Robles-Carrillo L, Robson T, Langer F, Desai H, Davila M, Amaya M, Francis JL, Amirkhosravi A., Bevacizumab immune complexes activate platelets and induce thrombosis in FCGR2A transgenic mice., *J. Thromb. Haemost.* (2009) 7 (1), 171-181

[Documento no patente 23] Robles-Carrillo L, Meyer T, Hatfield M, Desai H, Davila M, Langer F, Amaya M, Garber E, Francis JL, Hsu YM, Amirkhosravi A., Anti-CD40L immune complexes potently activate platelets in vitro and cause thrombosis in FCGR2A transgenic mice., *J. Immunol.* (2010) 185 (3), 1577-1583

[Documento no patente 24] Duffau P, Seneschal J, Nicco C, Richez C, Lazaro E, Douchet I, Bordes C, Viallard JF, Goulvestre C, Pellegrin JL, Weil B, Moreau JF, Batteux F, Blanco P., Platelet CD154 potentiates interferon-alpha secretion by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus., *Sci. Transl. Med.* (2010) 2 (47), 47-63

[Documento no patente 25] Desai DD, Harbers SO, Flores M, Colonna L, Downie MP, Bergtold A, Jung S, Clynes R., Fc gamma receptor IIB on dendritic cells enforces peripheral tolerance by inhibiting effector T cell responses., *J. Immunol.* (2007) 178 (10), 6217-6226

[Documento no patente 26] Richards JO, Karki S, Lazar GA, Chen H, Dang W, Desjarlais JR., Optimization of antibody binding to FcγRIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells., *Mol. Cancer Ther.* (2008) 7 (8) 2517-2527

Compendio de la invención

Problemas a resolver por la invención

La presente invención se logró en vista de las circunstancias anteriores. Como se ha mencionado antes, no se sabía que la actividad de unión hacia los receptores de Fcγ activadores y/o inhibidores de anticuerpos que se dirigen a antígenos solubles tuviera un efecto sobre la cinética plasmática de los anticuerpos o antígenos unidos por los anticuerpos en los organismos a los que se administra los anticuerpos. Más específicamente, un objetivo de la presente invención es suprimir el aumento en la concentración plasmática de un antígeno unido por una molécula de unión al antígeno administrando la molécula de unión al antígeno que tiene una actividad de unión hacia un antígeno patógeno presente en una forma soluble en el plasma, y también tiene una actividad de unión deseada hacia receptores de Fcγ activadores y/o inhibidores. Otro objetivo de la presente invención es optimizar la actividad de unión hacia los receptores de Fcγ activadores y/o inhibidores de moléculas de unión al antígeno contra los antígenos causantes de enfermedad presentes en una forma soluble en el plasma, y así optimizar la supresión del aumento de la concentración plasmática de antígenos unidos por las moléculas de unión a antígeno.

Medios para resolver los problemas

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones y/o ejemplos de la siguiente descripción que no están cubiertos por las reivindicaciones adjuntas no se consideran parte de la presente invención.

Específicamente, la presente invención proporciona moléculas de unión al antígeno que comprenden (i) un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones, (ii) un dominio de unión a FcγR que tiene actividad de unión selectiva a FcγRIIb, y (iii) un dominio de unión a FcRn que tiene actividad de unión a FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido, y métodos para disminuir la concentración plasmática del antígeno en comparación con antes de la administración de la molécula de unión al antígeno, que comprende la etapa de administrar la molécula. Además, la presente invención proporciona agentes para disminuir la concentración plasmática del antígeno, que comprenden una molécula de unión al antígeno que comprende (i) un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones, (ii) un dominio de unión a FcγR que tiene actividad de unión selectiva a FcγRIIb, y (iii) un dominio de unión a FcRn que tiene actividad de unión a FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de unión al antígeno que comprende (i) un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones, (ii) un dominio de unión a FcγR que tiene actividad de unión selectiva a FcγRIIb y (iii) un dominio de unión a FcRn que tiene actividad de unión a FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido. La presente invención también proporciona usos de la molécula de unión al antígeno para disminuir la concentración plasmática del antígeno, en donde la molécula comprende (i) un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones, (ii) un dominio de unión a FcγR que tiene actividad de unión selectiva a FcγRIIb, y (iii) un dominio de unión a FcRn que tiene actividad de unión a FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido. Además de lo anterior, la presente invención proporciona métodos de producción y/o métodos de selección de las moléculas de unión a antígeno. Aunque no se pretende particularmente limitar la invención, específicamente, se proporciona lo siguiente como una realización no limitante:

[1] una molécula de unión al antígeno para usar en un método de tratamiento eliminando el antígeno del plasma, en donde la molécula de unión al antígeno comprende un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno

varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones, y una región Fc en la que el aminoácido en la posición 238 es Asp y el aminoácido en la posición 271 es Gly indicado por la numeración EU, que se caracteriza por tener mayor actividad de unión a FcγRIIb en comparación con la región Fc presentada como IgG1 humana (SEQ ID NO: 14), en donde el dominio de unión al antígeno es una región variable de anticuerpo, y en donde la región Fc es una región Fc de IgG1 humana, en donde la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno que cambia dependiendo de las condiciones de concentración de iones se define por uno cualquiera o ambos de los siguientes (a) y (b):

(a) el valor de KD (Ca 3 μM)/KD (Ca 2 mM), que es la relación de la constante de disociación (KD) para un antígeno a una concentración baja de iones de calcio a la KD en unas condiciones de concentración alta de iones de calcio es 2 o más; y

(b) el valor de KD (pH5.8)/KD (pH7.4), que es la relación de KD para el antígeno en unas condiciones de intervalo de pH ácido a la KD en unas condiciones de intervalo de pH neutro, es 2 o más.

[2] La molécula de unión al antígeno para usar según [1], en donde la región Fc tiene una sustitución de aminoácido en al menos una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 233, 234, 237, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 272, 274, 296, 326, 327, 330, 331, 332, 333, 355, 356, 358, 396, 409 y 419 indicado por la numeración EU.

[3] La molécula de unión al antígeno para usar según [2], en donde los aminoácidos de la región Fc incluyen uno cualquiera o más de los siguientes aminoácidos indicados por la numeración EU:

Asp en la posición de aminoácido 233;

Tyr en la posición de aminoácido 234;

Asp en la posición de aminoácido 237;

Ile en la posición de aminoácido 264;

Glu en la posición de aminoácido 265;

uno cualquiera de Phe, Met y Leu en la posición de aminoácido 266;

uno cualquiera de Ala, Glu, Gly y Gln en la posición de aminoácido 267;

uno cualquiera de Asp, Glu y Gln en la posición de aminoácido 268;

Asp en la posición de aminoácido 269;

uno cualquiera de Asp, Phe, Ile, Met, Asn, Pro y Gln en la posición de aminoácido 272;

Gln en la posición de aminoácido 274;

Asp o Phe en la posición de aminoácido 296;

Ala o Asp en la posición de aminoácido 326;

Gly en la posición de aminoácido 327;

Lys o Arg en la posición de aminoácido 330;

Ser en la posición de aminoácido 331;

Thr en la posición de aminoácido 332;

uno cualquiera de Thr, Lys y Arg en la posición de aminoácido 333;

Gln en la posición de aminoácido 355;

Glu en la posición de aminoácido 356;

Met en la posición de aminoácido 358;

uno cualquiera de Asp, Glu, Phe, Ile, Lys, Leu, Met, Gln, Arg y Tyr en la posición de aminoácido 396;

Arg en la posición de aminoácido 409; y

Glu en la posición de aminoácido 419.

[4] La molécula de unión al antígeno para usar según uno cualquiera de [1] a [3], en donde la región Fc es una región

Fc en la que el aminoácido en la posición 238 es Asp y el aminoácido en la posición 271 es Gly indicado por la numeración EU en la región Fc incluida en la SEQ ID NO: 14.

[5] La molécula de unión al antígeno para usar según uno cualquiera de [1] a [4], en donde la actividad de unión a FcRn de la región Fc en condiciones de intervalo de pH ácido es mayor en comparación con la actividad de unión a FcRn de la región Fc incluida en la SEQ ID NO: 14.

[6] La molécula de unión al antígeno para usar según [5], en donde la región Fc con unión mejorada es una región Fc que tiene una sustitución de aminoácido en al menos una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 244, 245, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 260, 262, 265, 270, 272, 279, 283, 285, 286, 288, 293, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 316, 317, 318, 332, 339, 340, 341, 343, 356, 360, 362, 375, 376, 377, 378, 380, 382, 385, 386, 387, 388, 389, 400, 413, 415, 423, 424, 427, 428, 430, 431, 433, 434, 435, 436, 438, 439, 440, 442 y 447, indicado por la numeración EU, en la secuencia de aminoácidos de la región Fc incluida en la SEQ ID NO: 14.

[7] La molécula de unión al antígeno para usar según [6], en donde la región Fc con unión mejorada comprende al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en:

Leu en la posición de aminoácido 244;

Arg en la posición de aminoácido 245;

Pro en la posición de aminoácido 249;

Gln o Glu en la posición de aminoácido 250;

uno cualquiera de Arg, Asp, Glu y Leu en la posición de aminoácido 251;

uno cualquiera de Phe, Ser, Thr y Tyr en la posición de aminoácido 252;

Ser o Thr en la posición de aminoácido 254;

uno cualquiera de Arg, Gly, Ile y Leu en la posición de aminoácido 255;

uno cualquiera de Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Pro y Thr en la posición de aminoácido 256;

uno cualquiera de Ala, Ile, Met, Asn, Ser y Val en la posición de aminoácido 257;

Asp en la posición de aminoácido 258;

Ser en la posición de aminoácido 260;

Leu en la posición de aminoácido 262;

Lys en la posición de aminoácido 270;

Leu o Arg en la posición de aminoácido 272;

uno cualquiera de Ala, Asp, Gly, His, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp y Tyr en la posición de aminoácido 279;

uno cualquiera de Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp y Tyr en la posición de aminoácido 283;

Asn en la posición de aminoácido 285;

Phe en la posición de aminoácido 286;

Asn o Pro en la posición de aminoácido 288;

Val en la posición de aminoácido 293;

uno cualquiera de Ala, Glu, Gln y Met en la posición de aminoácido 307;

uno cualquiera de Ile, Pro y Thr en la posición de aminoácido 308;

Pro en la posición de aminoácido 309;

uno cualquiera de Ala, Glu, Ile, Lys, Leu, Met, Ser, Val y Trp en la posición de aminoácido 311;

uno cualquiera de Ala, Asp y Pro en la posición de aminoácido 312;

Ala o Leu en la posición de aminoácido 314;

- Lys en la posición de aminoácido 316;
 Pro en la posición de aminoácido 317;
 Asn o Thr en la posición de aminoácido 318;
 uno cualquiera de Phe, His, Lys, Leu, Met, Arg, Ser y Trp en la posición de aminoácido 332;
 5 uno cualquiera de Asn, Thr y Trp en la posición de aminoácido 339;
 Pro en la posición de aminoácido 341;
 uno cualquiera de Glu, His, Lys, Gln, Arg, Thr y Tyr en la posición de aminoácido 343;
 Arg en la posición de aminoácido 375;
 uno cualquiera de Gly, Ile, Met, Pro, Thr y Val en la posición de aminoácido 376;
 10 Lys en la posición de aminoácido 377;
 uno cualquiera de Asp, Asn y Val en la posición de aminoácido 378;
 uno cualquiera de Ala, Asn, Ser y Thr en la posición de aminoácido 380;
 uno cualquiera de Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp y Tyr en la posición de aminoácido 382;
 uno cualquiera de Ala, Arg, Asp, Gly, His, Lys, Ser y Thr en la posición de aminoácido 385;
 15 uno cualquiera de Arg, Asp, Ile, Lys, Met, Pro, Ser y Thr en la posición de aminoácido 386;
 uno cualquiera de Ala, Arg, His, Pro, Ser y Thr en la posición de aminoácido 387;
 uno cualquiera de Asn, Pro y Ser en la posición de aminoácido 389;
 Asn en la posición de aminoácido 423;
 Asn en la posición de aminoácido 427;
 20 uno cualquiera de Leu, Met, Phe, Ser y Thr en la posición de aminoácido 428;
 uno cualquiera de Ala, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val y Tyr en la posición de aminoácido 430;
 His o Asn en la posición de aminoácido 431;
 uno cualquiera de Arg, Gln, His, Ile, Lys, Pro y Ser en la posición de aminoácido 433;
 uno cualquiera de Ala, Gly, His, Phe, Ser, Trp y Tyr en la posición de aminoácido 434;
 25 uno cualquiera de Arg, Asn, His, Ile, Leu, Lys, Met y Thr en la posición de aminoácido 436;
 uno cualquiera de Lys, Leu, Thr y Trp en la posición de aminoácido 438;
 Lys en la posición de aminoácido 440; y
 Lys en la posición de aminoácido 442
 indicado por la numeración EU, en la secuencia de aminoácidos de la región Fc incluida en la SEQ ID NO: 14.
- 30 [8] La molécula de unión al antígeno para usar según uno cualquiera de [1] a [7], en donde la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo.
- [9] La molécula de unión al antígeno para usar según uno cualquiera de [1] a [8] caracterizada por que se trata el cáncer o una enfermedad inflamatoria.
- 35 [10] Una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión al antígeno como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para usar según uno cualquiera de [1] a [9].
- En la presente descripción, las siguientes frases se usan de manera sinónima: "uso de una molécula de unión al antígeno para eliminar antígeno del plasma, en donde la molécula de unión al antígeno comprende un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones, y una región Fc en la que el aminoácido en la posición 238 es Asp y el aminoácido en la posición 271 es Gly indicado por la numeración EU"; "un método para tratar una enfermedad causada por un antígeno, que comprende administrar
- 40

una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones, y una región Fc en la que el aminoácido en la posición 238 es Asp y el aminoácido en la posición 271 es Gly indicado por la numeración EU"; "una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones, y una región Fc en la que el aminoácido en la posición 238 es Asp y el aminoácido en la posición 271 es Gly indicado por la numeración EU"; "uso de una molécula de unión al antígeno en la producción de una composición farmacéutica, en donde la molécula de unión al antígeno comprende un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones, y una región Fc en la que el aminoácido en la posición 238 es Asp y el aminoácido en la posición 271 es Gly indicado por la numeración EU"; y "un procedimiento para producir una composición farmacéutica, que comprende el uso de una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones, y una región Fc en la que el aminoácido en la posición 238 es Asp y el aminoácido en la posición 271 es Gly indicado por la numeración EU".

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 muestra un mecanismo de acción no limitante para la eliminación del antígeno soluble del plasma, por administración de un anticuerpo que se une a un antígeno de una manera dependiente de la concentración de iones y cuya unión al receptor de Fcγ es mayor a un pH neutro en comparación con anticuerpos neutralizantes existentes.

La fig. 2 muestra una evolución temporal de la concentración del receptor de IL-6 humana en el plasma de ratones transgénicos con FcRn humano que recibieron Fv4-IgG1, que se une al receptor de IL-6 humana de una manera dependiente del pH, o H54/L28-IgG1.

La fig. 3 muestra una evolución temporal de la concentración del receptor de IL-6 humana en el plasma de ratones transgénicos con FcRn humano que recibieron Fv4-IgG1 que se une al receptor de IL-6 humana de una manera dependiente del pH, Fv4-IgG1-F760 que es una variante de Fv4-IgG1 que carece de unión a FcγR de ratón, Fv4-IgG1-F1022 que es una variantes de Fv4-IgG1 con unión a FcγR de ratón mejorada, o Fv4-IgG1-Fuc que es un anticuerpo Fv4-IgG1 con bajo contenido en fucosa.

La fig. 4 muestra una evolución temporal de la concentración del receptor de IL-6 humana en el plasma de ratones transgénicos con FcRn humano que recibieron Fv4-IgG1 o moléculas de unión al antígeno que comprenden como la cadena pesada, Fv4-IgG1-F1022 o Fv4-IgG1-F1093 que es una variante de Fv4-IgG1-F1022 con unión a FcRn mejorada en un intervalo de pH ácido.

La fig. 5 muestra una evolución temporal de la concentración de las moléculas de unión al antígeno administradas en el plasma de ratones transgénicos con FcRn humano que recibieron Fv4-IgG1 o moléculas de unión al antígeno que comprenden como la cadena pesada, Fv4-IgG1-F1022 o Fv4-IgG1-F1093 que es una variante de Fv4-IgG1-F1022 con unión a FcRn mejorada en un intervalo de pH ácido.

La fig. 6 muestra una evolución temporal de la concentración del receptor de IL-6 humana en el plasma de ratones transgénicos con FcRn humano que recibieron Fv4-IgG1, Fv4-IgG1-F1087 que es una variante de Fv4-IgG1 con unión a FcγR de ratón mejorada (en particular, unión a FcγRIIb de ratón y unión a FcγRIII de ratón aumentadas), y Fv4-IgG1-F1182 que es una variante de Fv4-IgG1 con unión a FcγR de ratón aumentada (en particular, unión a FcγRI de ratón y unión a FcγRIV de ratón aumentadas).

La fig. 7 muestra una evolución temporal de la concentración de las moléculas de unión al antígeno administradas en el plasma de ratones transgénicos con FcRn humano que recibieron Fv4-IgG1, Fv4-IgG1-F1087, y Fv4-IgG1-F1180 y Fv4-IgG1-F1412 que son variantes de Fv4-IgG1-F1087 con unión a FcRn mejorada en un intervalo de pH ácido.

La fig. 8 muestra una evolución temporal de la concentración de las moléculas de unión al antígeno administradas en el plasma de ratones transgénicos con FcRn humano que recibieron Fv4-IgG1, Fv4-IgG1-F1182, y Fv4-IgG1-F1181 que es una variante de Fv4-IgG1-F1182 con unión a FcRn mejorada en un intervalo de pH ácido.

La fig. 9 muestra una evolución temporal de la concentración del receptor de IL-6 humana en el plasma de ratones transgénicos con FcRn humano que recibieron Fv4-IgG1, Fv4-IgG1-F1087, y Fv4-IgG1-F1180 y Fv4-IgG1-F1412 que son variantes de Fv4-IgG1-F1087 con unión a FcRn mejorada en un intervalo de pH ácido.

La fig. 10 muestra una evolución temporal de la concentración del receptor de IL-6 humana en el plasma de ratones transgénicos con FcRn humano que recibieron Fv4-IgG1, Fv4-IgG1-F1182 y Fv4-IgG1-F1181 que es una variante de Fv4-IgG1-F1182 con unión a FcRn mejorada en un intervalo de pH ácido.

La fig. 11 muestra una evolución temporal de la concentración del receptor de IL-6 humana en el plasma de ratones normales que recibieron Fv4-mIgG1, Fv4-mIgG1-mF44 que es una variante de Fv4-mIgG1 con unión a FcγRIIb de ratón y unión a FcγRIII de ratón mejoradas, y Fv4-mIgG1-mF46 que es una variante de Fv4-mIgG1 con unión a FcγRIIb de ratón y unión a FcγRIII de ratón más mejoradas.

La fig. 12 muestra una evolución temporal de la concentración del receptor de IL-6 humana en el plasma de ratones deficientes en FcγRIII que recibieron Fv4-mIgG1, Fv4-mIgG1-mF44 que es una variante de Fv4-mIgG1 con unión a FcγRIIb de ratón y unión a FcγRIII de ratón mejoradas, y Fv4-mIgG1-mF46 que es una variante de Fv4-mIgG1 con unión a FcγRIIb de ratón y unión a FcγRIII de ratón más mejoradas.

- 5 La fig. 13 muestra una evolución temporal de la concentración del receptor de IL-6 humana en el plasma de ratones deficientes en la cadena y del receptor de Fc, que recibieron Fv4-mIgG1, Fv4-mIgG1-mF44 que es una variante de Fv4-mIgG1 con unión a FcγRIIb de ratón y unión a FcγRIII de ratón mejoradas, y Fv4-mIgG1-mF46 que es una variante de Fv4-mIgG1 con unión a FcγRIIb de ratón y unión a FcγRIII de ratón más mejoradas.

- 10 La fig. 14 muestra una evolución temporal de la concentración del receptor de IL-6 humana en el plasma de ratones deficientes en FcγRIIb que recibieron Fv4-mIgG1, Fv4-mIgG1-mF44 que es una variante de Fv4-mIgG1 con unión a FcγRIIb de ratón y unión a FcγRIII de ratón aumentadas, y Fv4-mIgG1-mF46 que es una variante de Fv4-mIgG1 con unión a FcγRIIb de ratón y unión a FcγRIII de ratón más aumentadas.

La fig. 15 muestra un resultado de evaluar la capacidad de agregación de plaquetas del complejo inmunitario de omalizumab-G1d-v3/IgE por el ensayo de agregación de plaquetas derivadas de donantes con el alotipo FcγRIIa (R/H).

- 15 La fig. 16 muestra un resultado de evaluar la capacidad de agregación de plaquetas del complejo inmunitario de omalizumab-G1d-v3/IgE por el ensayo de agregación de plaquetas derivadas de donantes con el alotipo FcγRIIa (H/H).

- 20 La fig. 17 muestra un resultado de evaluar la expresión de CD62p en la superficie de membrana de plaquetas lavadas. El área rellena de negro en la gráfica indica un resultado de estimulación de ADP después de reacción con PBS. El área que no está rellena en la gráfica indica un resultado de estimulación de ADP después de reacción con el complejo inmunitario.

La fig. 18 muestra un resultado de evaluar la expresión de intergrina activa en la superficie de membrana de plaquetas lavadas. El área rellena de negro en la gráfica indica un resultado de estimulación de ADP después de reacción con PBS. El área que no está rellena en la gráfica indica un resultado de estimulación de ADP después de reacción con el complejo inmunitario.

- 25 La figura 19 muestra una gráfica en la que el eje horizontal muestra el valor relativo de la actividad de unión a FcγRIIb de cada variante de PD, y el eje vertical muestra el valor relativo de la actividad de unión a FcγRIIa tipo R de cada variante de PD. El valor de la cantidad de unión de cada variante de PD a cada FcγR se dividió entre el valor de la cantidad de unión de IL6R-F652/IL6R-L, que es un anticuerpo de control antes de introducción de la alteración (IL6R-F652, definido por SEQ ID NO: 61, es una cadena pesada de anticuerpo que comprende un Fc alterado con sustitución de Pro en la posición 238 (numeración de la UE) con Asp), en cada FcγR; y después el valor obtenido se multiplicó por 100, y se usó como el valor de actividad de unión relativa para cada variante PD a cada FcγR. La gráfica de F652 en la figura muestra el valor para IL6R-F652/IL6R-L.

- 35 La figura 20 muestra una gráfica en la que el eje vertical muestra el valor relativo de la actividad de unión a FcγRIIb de variantes producidas por la introducción de cada alteración en GpH7-B3 (SEQ ID NO: 63) / GpL16-k0 que no tiene la alteración P238D, y el eje horizontal muestra el valor relativo de la actividad de unión a FcγRIIb de las variantes producidas por introducción de cada alteración en IL6R-F652 (SEQ ID NO: 61)/IL6R-L que tiene la alteración P238D. El valor de la cantidad de unión a FcγRIIb de cada variante se dividió entre el valor de la cantidad de unión a FcγRIIb del anticuerpo previamente alterado; y después el valor obtenido se multiplicó por 100, y se usó como el valor de la actividad de unión relativa. Aquí, la región A contiene alteraciones que presentan el efecto de mejorar la unión a FcγRIIb tanto en casos en los que se introduce una alteración en GpH7-B3 / GpL16-k0 que no tiene P238D como donde se introduce una alteración en IL6R-F652 / IL6R-L que tiene P238D. La región B contiene alteraciones que presentan el efecto de aumentar la unión a FcγRIIb cuando se introduce en GpH7-B3 / GpL16-k0 que no tiene P238D, pero no presentan el efecto de aumentar la unión a FcγRIIb cuando se introduce en IL6R-F652 / IL6R-L que tiene P238D.

- 45 La figura 21 muestra una estructura cristalina del complejo de Fc (P238D) / región extracelular de FcγRIIb.

La figura 22 muestra una imagen de superposición de la estructura cristalina del complejo de Fc(P238D) / región extracelular de FcγRIIb y la estructura modelo del complejo de Fc(WT) / región extracelular de FcγRIIb, con respecto a la región extracelular de FcγRIIb y el dominio A de CH2 Fc por el ajuste de mínimos cuadrados basado en las distancias de pares de átomos Ca.

- 50 La figura 23 muestra la comparación de la estructura detallada alrededor de P238D después de superponer la estructura cristalina del complejo de Fc(P238D) / región extracelular de FcγRIIb y la estructura modelo del complejo de Fc(WT) / región extracelular de FcγRIIb con respecto al único dominio A de CH2 de Fc o el único dominio B de CH2 de Fc por el ajuste de mínimos cuadrados basado en las distancias de pares de átomos Ca.

- 55 La figura 24 muestra que se puede encontrar un enlace de hidrógeno entre la cadena principal de Gly en la posición 237 (indicada por la numeración EU) en el dominio A de Fc CH2, y Tyr en la posición 160 en FcγRIIb en la estructura cristalina del complejo de Fc(P238D) / región extracelular de FcγRIIb.

La figura 25 muestra que se puede encontrar una interacción electrostática entre el Asp en la posición 270 (indicada por la numeración EU) en el dominio B de Fc CH2 y la Arg en la posición 131 en FcγRIIb en la estructura cristalina del complejo de Fc(P238D) / región extracelular de FcγRIIb.

5 La figura 26 muestra una gráfica en la que el eje horizontal muestra el valor relativo de la actividad de unión a FcγRIIb de cada variante 2B, y el eje vertical muestra el valor relativo de la actividad de unión a FcγRIIa de tipo R de cada variante 2B. El valor para la cantidad de unión de cada variante 2B a cada FcγR se dividió entre el valor para la cantidad de unión de un anticuerpo de control antes de la alteración (Fc alterado con sustitución de Pro en la posición 238 (indicado por la numeración EU) por Asp) a cada FcγR; y después el valor obtenido se multiplicó por 100, y se usó como el valor de la actividad de unión relativa de cada variante 2B hacia cada FcγR.

10 La figura 27 muestra la Glu en la posición 233 (indicada por la numeración EU) en la cadena A de Fc y los restos circundantes en la región extracelular de FcγRIIb en la estructura cristalina del complejo de Fc(P238D) / región extracelular de FcγRIIb.

15 La figura 28 muestra la Ala en la posición 330 (indicada por la numeración EU) en la cadena A de Fc y los restos circundantes en la región extracelular de FcγRIIb en la estructura cristalina del complejo de Fc(P238D) / región extracelular de FcγRIIb.

La figura 29 muestra las estructuras de la Pro en la posición 271 (numeración EU) de la cadena B de Fc después de superponer las estructuras cristalinas del complejo de Fc(P238D) / región extracelular de FcγRIIb y el complejo de Fc(WT) / región extracelular de FcγRIIIa por el ajuste de mínimos cuadrados basado en las distancias de pares de átomos Cα con respecto a la cadena B de Fc.

20 La figura 30 muestra una imagen del complejo de Fc(P208) / región extracelular de FcγRIIb determinado por análisis de estructura cristalina de rayos X. Para cada uno de los dominios CH2 y CH3 en la porción Fc, los del lado izquierdo se denominan dominio A y los del lado derecho se denominan dominio B.

25 La figura 31 muestra la comparación después de superponer las estructuras del complejo de Fc(P208) / región extracelular de FcγRIIb y complejo de Fc(WT) / región extracelular de FcγRIIa (código PDB: 3RY6) determinado por análisis de estructura cristalina de rayos X con respecto al dominio A de CH2 de la porción Fc por ajuste de mínimos cuadrados basado distancias de pares de átomos Cα. En el diagrama, la estructura dibujada con una línea gruesa muestra el complejo de Fc(P208) / región extracelular de FcγRIIb, mientras que la estructura dibujada con una línea delgada indica la estructura del complejo de Fc(WT) / región extracelular de FcγRIIa. Solo se dibuja el dominio A de CH2 de la porción Fc para el complejo de Fc(WT) / región extracelular de FcγRIIa.

30 La Fig. 32 muestra en la estructura cristalina de rayos X del complejo de Fc(P208) / región extracelular de FcγRIIb, una estructura detallada alrededor de Asp en la posición 237 (numeración EU) en el dominio A de CH2 de la porción Fc, que forma un enlace de hidrógeno con Tyr en la posición 160 en FcγRIIb en el resto de la cadena principal.

35 La figura 33 muestra en la estructura cristalina de rayos X del complejo de Fc(P208) / región extracelular de FcγRIIb, la estructura de los restos de aminoácidos alrededor de Asp en la posición 237 (numeración EU) en el dominio A de CH2 de la porción Fc, que forma un enlace de hidrógeno con Tyr en la posición 160 en FcγRIIb en el resto de la cadena principal.

40 La figura 34 muestra la comparación alrededor del bucle en las posiciones 266 a 271 (numeración EU) después de superponer las estructuras cristalinas de rayos X del complejo de Fc(P238D) / región extracelular de FcγRIIb que se muestra en el ejemplo 10 y el complejo de Fc(P208) / región extracelular de FcγRIIb con respecto al dominio B de CH2 de la porción Fc por el ajuste de mínimos cuadrados basado en las distancias de pares de átomos Cα. En comparación con Fc (P238D), Fc (P208) tiene la alteración H268D en la posición 268 (numeración EU) y la alteración P271G en la posición 271 (numeración EU) en el bucle.

45 La figura 35 es un diagrama que muestra la estructura alrededor de Ser239 en el dominio B de CH2 de la porción Fc en la estructura cristalina de rayos X del complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIb, junto con la densidad electrónica con el coeficiente 2Fo-Fc determinado por análisis de estructura cristalina de rayos X.

La Fig. 36 muestra la comparación después de superponer las estructuras tridimensionales del complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIaR y el complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIb determinado por análisis de estructura cristalina de rayos X por el ajuste de mínimos cuadrados basado en distancias de pares de átomos Cα.

50 La Fig. 37 muestra la comparación alrededor de Asp en la posición 237 (numeración EU) en el dominio A de CH2 de la porción Fc entre las estructuras cristalinas de rayos X del complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIaR y el complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIb, junto con la densidad electrónica con coeficiente 2Fo-Fc determinado por análisis de estructura cristalina de rayos X.

55 La figura 38 muestra la comparación alrededor del Asp en la posición 237 (numeración EU) en el dominio B de CH2 de la porción Fc entre las estructuras cristalinas de rayos X del complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIaR

y el complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIb, junto con la densidad electrónica con coeficiente 2Fo-Fc determinado por análisis de estructura cristalina de rayos X.

La figura 39 muestra la comparación entre las secuencias de la región constante de G1d y G4d. En el diagrama, los aminoácidos encuadrados con marco grueso indican posiciones con diferentes restos de aminoácidos entre G1d y G4d.

- 5 La figura 40 muestra el cambio en la concentración de anticuerpos en el plasma de GA2-IgG1 y GA2-F1087 en ratones normales.

La Fig. 41 muestra el cambio en la concentración de hlgA en el plasma en ratones normales que recibieron GA2-IgG1 y GA2-F1087.

- 10 La Fig. 42 muestra el cambio en la concentración de anticuerpos en el plasma de 278-IgG1 y 278-F1087 en ratones normales.

La fig. 43 muestra el cambio en la concentración de hlgE en el plasma (Asp6) en ratones C57BL/6J que recibieron 278-IgG1 y 278-F1087.

- 15 La fig. 44 muestra una evolución temporal de la concentración de anticuerpo de ratón anti-receptor de IL-6 humano en el plasma de ratones normales que recibieron Fv4-mlgG1 y Fv4-mlgG1-MB367, que es una variante de Fv4-mlgG1 con unión a FcγRIIb de ratón aumentada.

La figura 45 muestra una evolución temporal de la concentración de receptor de IL-6 humano soluble en el plasma de ratones normales que recibieron Fv4-mlgG1 y Fv4-mlgG1-MB367, que es una variante de Fv4-mlgG1 con unión a FcγRIIb de ratón aumentada.

Modo para llevar a cabo la invención

- 20 Las definiciones y descripción detallada a continuación se proporcionan para ayudar a entender la presente descripción ilustrada en la presente memoria.

Aminoácidos

- 25 En la presente memoria, los aminoácidos se describen con los códigos de una o tres letras, o ambos, por ejemplo, Ala/A, Leu/L, Arg/R, Lys/K, Asn/N, Met/M, Asp/D, Phe/F, Cys/C, Pro/P, Gln/Q, Ser/S, Glu/E, Thr/T, Gly/G, Trp/W, His/H, Tyr/Y, Ile/I, o Val/V.

Alteración de aminoácidos

- 30 Para las alteraciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de una molécula de unión al antígeno, se pueden usar adecuadamente métodos conocidos, tales como métodos de mutagénesis dirigida al sitio (Kunkel et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* (1985) 82, 488-492)) y la PCR por extensión de superposición. Se añaden adecuadamente adiciones, delecciones y/o sustituciones de un aminoácido por estos métodos conocidos. Sustituir restos de aminoácidos significa sustituir un resto de aminoácidos por otro resto de aminoácidos con el fin de alterar aspectos tales como los siguientes (a) a (c):

(a) la estructura de la cadena principal de un polipéptido en una región de estructura helicoidal o una región de estructura de lámina;

- 35 (b) la carga o hidrofobicidad en un sitio objetivo; o

(c) la longitud de una cadena lateral.

Los restos de aminoácidos se clasifican en los siguientes grupos basándose en las propiedades de las cadenas laterales incluidas en sus estructuras:

(1) hidrófobas: norleucina, Met, Ala, Val, Leu e Ile;

- 40 (2) hidrófilas neutras: Cys, Ser, Thr, Asn y Gln:

(3) ácidas: Asp y Glu;

(4) básicas: His, Lys y Arg;

(5) restos que afectan a la orientación de la cadena: Gly y Pro; y

(6) aromáticos: Trp, Tyr y Phe.

- 45 La sustitución entre restos de aminoácidos dentro de cada uno de estos grupos se denomina sustitución conservadora. Por otro lado, la sustitución entre restos de aminoácidos de diferentes grupos de aminoácidos se denomina sustitución

no conservadora. Las sustituciones en la presente descripción pueden ser sustituciones conservadoras o sustituciones no conservadoras, o una combinación de sustituciones conservadoras y no conservadoras. Además, se puede usar una pluralidad de métodos conocidos como métodos de alteración de aminoácidos para la sustitución de aminoácidos no naturales (*Annu. Rev. Biophys Biomol. Struct.* (2006) 35, 225-249; y *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2003) 100 (11), 6353-6357). Por ejemplo, se usa adecuadamente un sistema de traducción sin células (Clover Direct (Protein Express)) que contiene un ARNt que tiene el aminoácido no natural unido a un ARNt supresor de ámbar complementario del codón UAG (codón ámbar), que es uno de los codones de parada.

Además, se puede usar adecuadamente una expresión que usa códigos de aminoácidos de una letra del aminoácido antes de la alteración y el aminoácido después de la alteración antes y después de un número que indica una posición específica, respectivamente, como una expresión para una alteración de aminoácidos. Por ejemplo, la alteración P238D, que se usa cuando se sustituye un aminoácido de la región Fc incluida en una región constante de anticuerpo, expresa la sustitución de Pro en la posición 238 (según la numeración EU) por Asp. Es decir, el número muestra la posición del aminoácido de acuerdo con la numeración EU, el código de aminoácidos de una letra escrito antes del número muestra el aminoácido antes de la sustitución y el código de aminoácidos de una letra escrito después del número muestra el aminoácido después de la sustitución.

Y/o

Como se usa en el presente documento, el término "y/o" significa una combinación de los términos antes y después de la frase expuesta "y/o", e incluye todas las combinaciones donde "y" y "o" se combinan adecuadamente. Específicamente, por ejemplo, "los aminoácidos en las posiciones 326, 328 y/o 428 están sustituidos" incluye una variación de alteraciones de los siguientes aminoácidos:

aminoácido(s) en (a) posición 326, (b) posición 328, (c) posición 428, (d) posiciones 326 y 328, (e) posiciones 326 y 428, (f) posiciones 328 y 428, y (g) posiciones 326, 328 y 428.

Antígenos

En el presente documento, los "antígenos" no están particularmente limitados en su estructura, siempre que comprendan epítopos a los que se unen los dominios de unión al antígeno. En otras palabras, los antígenos pueden ser sustancias inorgánicas u orgánicas. Los antígenos incluyen, por ejemplo, las siguientes moléculas: 17-IA, 4-1BB, 4Dc, 6-keto-PGF1a, 8-iso-PGF2a, 8-oxo-dG, receptor de adenosina A1, A33, ACE, ACE-2, activina, activina A, activina AB, activina B, activina C, activina RIA, activina RIA ALK-2, activina RIB ALK-4, activina RIIA, activina RIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM 17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, adresina, aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, alfa-1-antitripsina, antagonista de alfa-V/beta-1, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, ARC, ART, artemina, anti-Id, ASPARTIC, péptido natriurético auricular, integrina av/b3, Axl, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, factor estimulador de linfocitos B (BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2 BMP-2a, BMP-3 Osteogenina, BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II (BRK-3), BMP, b-NGF, BOK, bombesina, factor neurotrófico derivado de huesos, BPDE, BPDE-DNA, BTC, factor del complemento 3 (C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, calcitonina, cAMP, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno asociado a cáncer, catepsina A, catepsina B, catepsina C/D/PPi, catepsina D, catepsina E, catepsina H, catepsina L, catepsina O, catepsina S, catepsina V, catepsina X/Z/P, CBL, CCI, CCK2, CCL, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR, CCR1, CCR10, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33 (proteína p67), CD34, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80 (B7-1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, cGMP, CINC, toxina Botulinum, toxina Clostridium perfringens, CKb8-1, CLC, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, antígeno asociado a tumores citoqueratina, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, factor regulador del complemento (factor acelerador del decaimiento), des (1-3)-IGF-I (IGF-1 cerebral), Dhh, digoxina, DNAM-1, Dnasa, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), EMA, EMMPRIN, ENA, receptor de endotelina, encefalinasa, eNOS, Eot, eotaxina 1, EpCAM, efrina B2/EphB4, EPO, ERCC, E-selectina, ET-1, factor IIa, factor VII, factor VIIIc, factor IX, proteína de activación de fibroblastos (FAP), Fas, FcR1, FEN-1, ferritina, FGF, FGF-19, FGF-2, FGF3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, fibrina, FL, FLIP, Flt-3, Flt-4, hormona estimuladora del folículo, fractalquina, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14, CDMP-1), GDF-6 (BMP-13, CDMP-2), GDF-7 (BMP-12, CDMP-3), GDF-8 (miostatina), GDF-9, GDF-15 (MIC-1), GDNF, GDNF, GFAP, GFRa-1, GFR-alfa1, GFR-alfa2, GFR-alfa3, GTR, glucagón, Glut4, glucoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, hormona liberadora de la hormona del crecimiento, hapteno (NP-cap o NIP-cap), HB-EGF, HCC, glucoproteína de la envuelta gB de HCMV, glucoproteína de la envuelta gH de HCMV, HCMV UL, factor de crecimiento hematopoyético (HGF), Hep B gp120, heparanasa, Her2, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), glucoproteína gB del virus

herpes simplex (HSV), glucoproteína gD del HSV, HGFA, antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), HIV gp120, bucle V3 de gp 120 del HIV IIIB, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMFG PEM, HRG, Hrk, miosina cardiaca humana, citomegalovirus humano (HCMV), hormona del crecimiento humana (HGH), HVEM, 1-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, receptor de IgA, IgE, IGF, proteína de unión a IGF, IGF-1R, IGFBP, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-18R, IL-23, interferón (INF)-alfa, INF-beta, INF-gamma, inhibina, iNOS, cadena A de insulina, cadena B de insulina, factor de crecimiento similar a insulina 1, integrina alfa2, integrina alfa3, integrina alfa4, integrina alfa4/beta1, integrina alfa4/beta7, integrina alfa5 (alfa V), integrina alfa5/beta1, integrina alfa5/beta3, integrina alfa6, integrina beta1, integrina beta2, interferón gamma, IP-10, I-TAC, JE, calicreína 2, calicreína 5, calicreína 6, calicreína 11, calicreína 12, calicreína 14, calicreína 15, calicreína L1, calicreína L2, calicreína L3, calicreína L4, KC, KDR, factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), laminina 5, LAMP, LAP, LAP (TGF-1), TGF-1 latente, TGF-1 bp1 latente, LBP, LDGF, LECT2, lefty, antígeno de Lewis-Y, antígeno asociado a Lewis-Y, LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, lipoproteína, LIX, LKN, Lptn, L-selectina, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, superficie pulmonar, hormona luteinizante, receptor de linfotóxina beta, Mac-1, MADCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCP-2, MCP, M-CSF, MDC, Mer, METALOPROTEASAS, receptor de MGDF, MGMT, MHC (HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-alfa, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MPIF, Mpo, MSK, MSP, mucina (Muc1), MUC18, sustancia inhibidora mulleriana, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, N-C adherina, NCA 90, NCAM, NCAM, neprilisina, neurotrofina-3, -4, o -6, neurturina, factor de crecimiento nervioso (NGF), NGFR, NGF-beta, nNOS, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L, OX40R, p150, p95, PADPr, hormona paratiroidea, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-cadherina, PCNA, PDGF, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIN, PLA2, fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), PIGF, PLP, PP14, proinsulina, prorelaxina, proteína C, PS, PSA, PSCA, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, cadena A de relaxina, cadena B de relaxina, renina, virus sincitial respiratorio (RSV) F, RSV Fgp, Ret, factor reumatoide, RLIP76, RPA2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, SERINE, seroalbúmina, sFRP-3, Shh, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72 (glucoproteína asociada a tumor-72), TARC, TCA-3, receptor de linfocitos T (por ejemplo, receptor de linfocitos T alfa/beta), TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, fosfatasa alcalina similar a PLAP testicular, Tfr, TGF, TGF-alfa, TGF-beta, TGF-beta específico de Pan, TGF-betaRI (ALK-5), TGF-betaRII, TGF-betaRIIb, TGF-betaRIII, TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4, TGF-beta5, trombina, Ck-1 de timo, hormona estimuladora de tiroides, Tie, TIMP, TIQ, factor tisular, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, TNF-alfa, TNF-alfabeta, TNF-beta2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2, DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5, KILLER, TRICK-2A, TRICK-B), TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1, LIT, TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2, TRUND), TNFRSF11A (RANK ODF R, TRANCE R), TNFRSF11B (OPG OCIF, TR1), TNFRSF12 (TWEAK R FN14), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF R), TNFRSF14 (HVEM ATAR, HveA, LIGHT R, TR2), TNFRSF16 (NGFR p75NTR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR), TNFRSF19 (TROY TAJ, TRADE), TNFRSF19L (REL), TNFRSF1A (TNF RI CD120a, p55-60), TNFRSF1B (TNF RII CD120b, p75-80), TNFRSF26 (TNFRH3), TNFRSF3 (LTbR TNF RIII, TNFC R), TNFRSF4 (OX40 ACT35, TXGP1 R), TNFRSF5 (CD40 p50), TNFRSF6 (Fas Apo-1, APT1, CD95), TNFRSF6B (DcR3 M68, TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1BB CD137, ILA), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFRSF25 (DR3 Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-1), TNFSF10 (ligando de Apo-2 TRAIL, TL2), TNFSF11 (ligando de ODF TRANCE/RANK, ligando de OPG), TNFSF12 (ligando de Apo-3 TWEAK, ligando de DR3), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS, TALL1, THANK, TNFSF20), TNFSF14 (ligando de HVEM LIGHT, LTg), TNFSF15 (TL1A/VEGI), TNFSF18 (ligando GITR ligando AITR, TL6), TNFSF1A (TNF-a Conectina, DIF, TNFSF2), TNFSF1B (TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC, p33), TNFSF4 (ligando de OX40 gp34, TXGP1), TNFSF5 (ligando de CD40 CD154, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6 (ligando de Fas ligando de Apo-1, ligando de APT1), TNFSF7 (ligando de CD27 CD70), TNFSF8 (ligando de CD30 CD153), TNFSF9 (ligando de 4-1BB ligando de CD137), TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, receptor de transferrina, TRF, Trk, TROP-2, TSG, TSLP, antígeno asociado a tumor CA125, antígeno asociado a tumor que expresa carbohidratos asociados a Lewis-Y, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, uroquinasa, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-Cadherina, VE-cadherina-2, VEGFR-1 (flt-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3 (flt-4), VEGI, VIM, antígeno de virus, VLA, VLA-1, VLA-4, integrina VNR, factor von Willebrand, WIF-1, WNT1, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD, HMGB1, IgA, Aβ, CD81, CD97, CD98, DDR1, DKK1, EREG, Hsp90, IL-17/IL-17R, IL-20/IL-20R, LDL oxidada, PCSK9, precalicreína, RON, TMEM16F, SOD1, Cromogranina A, Cromogranina B, tau, VAP1, quinínogeno de alto peso molecular, IL-31, IL-31R, Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9, EPCR, C1, C1q, C1r, C1s, C2, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4a, C4b, C5, C5a, C5b, C6, C7, C8, C9, factor B, factor D, factor H, properdina, esclerostina, fibrinógeno, fibrina, protrombina, trombina, factor tisular, factor V, factor Va, factor VII, factor VIII, factor VIIa, factor VIIIa, factor IX, factor IXa, factor X, factor Xa, factor XI, factor XIa, factor XII, factor XIIa, factor XIII, factor XIIIa, TFPI, antitrombina III, EPCR, trombosmodulina, TAPI, tPA, plasminógeno, plasmina, PAI-1, PAI-2, GPC3, Sindecano-1, Sindecano-2, Sindecano-3, Sindecano-4, LPA, y SIP; y receptores para hormonas y factores de crecimiento.

Aunque se mencionan receptores como ejemplos de los antígenos mencionados anteriormente, cuando estos receptores existen en formas solubles en fluidos biológicos tales como el plasma, pueden formar complejos con las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción. Por lo tanto, siempre que los receptores mencionados anteriormente existan en sus formas solubles en fluidos biológicos tales como el plasma, se pueden usar como antígenos que pueden formar complejos de la presente descripción uniéndose a una molécula de unión al antígeno

descrita en la presente memoria. Un ejemplo de una realización no limitante de dicho receptor soluble es IL-6R soluble, que es una proteína que consiste en los aminoácidos en las posiciones 1 a 357 en la secuencia del polipéptido IL-6R de la SEQ ID NO: 1 como se describe en Mullberg et al. (*J. Immunol.* (1994) 152 (10), 4958-4968).

Los antígenos solubles se mencionan como ejemplos de los antígenos mencionados anteriormente, y las soluciones en las que existen los antígenos no están limitadas. Los antígenos solubles pueden existir en fluidos biológicos, o más específicamente en todos los fluidos que llenan el espacio entre tejidos y células o vasos en los organismos. En una realización no limitante, los antígenos a los que se unen las moléculas de unión al antígeno descritas en la presente memoria pueden estar presentes en fluidos extracelulares. En los vertebrados, el fluido extracelular es un término general para plasma, líquido intersticial, linfa, tejido conectivo compacto, líquido cerebroespinal, líquido cefalorraquídeo, líquido de punción, líquido sinovial o dichos componentes del hueso y cartílago, líquido alveolar (líquido de lavado broncoalveolar), líquido peritoneal, líquido pleural, líquido pericárdico, líquido quístico, humor acuoso (hidatoide) o dichos fluidos transcelulares (diversos fluidos en las cavidades glandulares y fluidos en la cavidad del tracto digestivo y otros fluidos de la cavidad corporal producidos como resultado del transporte activo/ actividades secretoras de las células).

Epítipo

"Epítipo" significa un determinante antigénico en un antígeno, y se refiere a un sitio del antígeno al que se une el dominio de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno descrita en la presente memoria. Así, por ejemplo, el epítipo se puede definir de acuerdo con su estructura. Alternativamente, el epítipo se puede definir de acuerdo con la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno que reconoce el epítipo. Cuando el antígeno es un péptido o polipéptido, el epítipo se puede especificar por los restos de aminoácidos que forman el epítipo. Alternativamente, cuando el epítipo es una cadena de azúcar, el epítipo se puede especificar por su estructura específica de la cadena de azúcar.

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

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

Actividad de unión

A continuación se describen ejemplos de un método para evaluar la unión del epítipo por una molécula de unión al antígeno de ensayo que contiene un dominio de unión al antígeno de IL-6R. De acuerdo con los siguientes ejemplos, los métodos para evaluar la unión del epítipo por una molécula de unión al antígeno de ensayo que contiene un dominio de unión al antígeno para un antígeno distinto de IL-6R, también se pueden llevar a cabo de manera adecuada.

Por ejemplo, se puede confirmar si una molécula de unión al antígeno de ensayo que contiene un dominio de unión al antígeno de IL-6R reconoce un epítipo lineal en la molécula de IL-6R, por ejemplo, como se menciona a continuación. Se sintetiza un péptido lineal que comprende una secuencia de aminoácidos que forma el dominio extracelular de IL-6R para el propósito anterior. El péptido se puede sintetizar químicamente o se puede obtener mediante técnicas de ingeniería genética usando una región que codifica la secuencia de aminoácidos que corresponde al dominio extracelular en un ADNc de IL-6R representado por la SEQ ID NO: 2. Después, se evalúa en una molécula de unión al antígeno de ensayo que contiene un dominio de unión al antígeno de IL-6R, su actividad de unión hacia un péptido lineal que comprende la secuencia de aminoácidos que forma el dominio extracelular. Por ejemplo, se puede usar un péptido lineal inmovilizado como un antígeno por ELISA para evaluar la actividad de unión de la molécula de unión al antígeno hacia el péptido. Alternativamente, la actividad de unión hacia un péptido lineal se puede evaluar basándose en el nivel en que el péptido lineal inhibe la unión de la molécula de unión al antígeno a las células que expresan IL-6R. Estos ensayos pueden demostrar la actividad de unión de la molécula de unión al antígeno hacia el péptido lineal.

Se puede evaluar como sigue si una molécula de unión al antígeno de ensayo que contiene un dominio de unión al antígeno de IL-6R reconoce un epítipo conformacional. Las células que expresan IL-6R se preparan para el propósito anterior. Se puede determinar que una molécula de unión al antígeno de ensayo que contiene un dominio de unión al antígeno de IL-6R reconoce un epítipo conformacional cuando se une fuertemente a células que expresan IL-6R tras el contacto, pero no se une sustancialmente a un péptido lineal inmovilizado que comprende una secuencia de

aminoácidos que forma el dominio extracelular de IL-6R. En el presente documento, "no se une sustancialmente" significa que la actividad de unión es 80% o menos, generalmente 50% o menos, preferiblemente 30% o menos, y en particular preferiblemente 15% o menos en comparación con la actividad de unión hacia células que expresan IL-6R humano.

5 Los métodos para analizar la actividad de unión de una molécula de unión al antígeno de ensayo que contiene un dominio de unión al antígeno de IL-6R hacia células que expresan IL-6R incluyen, por ejemplo, los métodos descritos en *Antibodies: A Laboratory Manual* (Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 359-420). Específicamente, la evaluación se puede realizar basándose en el principio de ELISA o la separación de células activadas por fluorescencia (FACS) usando células que expresan IL-6R como antígeno.

10 En el formato de ELISA, la actividad de unión de una molécula de unión al antígeno de ensayo que contiene un dominio de unión al antígeno de IL-6R hacia las células que expresan IL-6R se puede evaluar cuantitativamente comparando los niveles de señal generados por reacción enzimática. Específicamente, se añade un complejo de polipéptidos de ensayo a una placa de ELISA en la que están inmovilizadas células que expresan IL-6R. Después, la molécula de unión al antígeno de ensayo unida a las células se detecta usando un anticuerpo marcado con enzima que reconoce la molécula de unión al antígeno de ensayo. Alternativamente, cuando se usa FACS, se prepara una serie de diluciones de una molécula de unión al antígeno de ensayo, y se puede determinar el título de unión del anticuerpo para las células que expresan IL-6R para comparar la actividad de unión de la molécula de unión al antígeno de ensayo hacia células que expresan IL-6R.

20 La unión de una molécula de unión al antígeno de ensayo hacia un antígeno expresado en la superficie de células suspendidas en tampón o similar se puede detectar usando un citómetro de flujo. Los citómetros de flujo conocidos incluyen, por ejemplo, los siguientes dispositivos:

FACSCanto™ II

FACSAria™

FACSArray™

25 FACSVantage™ SE

FACSCalibur™ (todos son nombres comerciales de BD Biosciences)

EPICS ALTRA HyPerSort

Cytomics FC 500

EPICS XL-MCLADC EPICS XLADC

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

Los métodos preferidos para ensayar la actividad de unión de una molécula de unión al antígeno de ensayo que contiene un dominio de unión al antígeno de IL-6R hacia un antígeno incluyen, por ejemplo, el siguiente método. Primero, las células que expresan IL-6R se hacen reaccionar con una molécula de unión al antígeno de ensayo, y después esto se tiñe con un anticuerpo secundario marcado con FITC que reconoce la molécula de unión al antígeno.

35 La molécula de unión al antígeno de ensayo se diluye adecuadamente con un tampón adecuado para preparar la molécula a una concentración deseada. Por ejemplo, la molécula se puede usar en una concentración dentro del intervalo de 10 µg/ml a 10 ng/ml. Después, se determinan la intensidad de fluorescencia y el recuento celular usando FACSCalibur (BD). La intensidad de fluorescencia obtenida por análisis usando el software CELL QUEST (BD), es decir, el valor de la media geométrica, refleja la cantidad de anticuerpo unido a las células. Es decir, la actividad de unión de una molécula de unión al antígeno de ensayo, que está representada por la cantidad de la molécula de unión al antígeno de ensayo unida, se puede determinar midiendo el valor medio geométrico.

40 Se puede evaluar si una molécula de unión al antígeno de ensayo que contiene un dominio de unión al antígeno de IL-6R comparte un epítipo común con otra molécula de unión al antígeno basándose en la competencia entre las dos moléculas por el mismo epítipo. La competencia entre las moléculas de unión al antígeno se puede detectar mediante un ensayo de bloqueo cruzado o similar. Por ejemplo, el ensayo ELISA competitivo es un ensayo de bloqueo cruzado preferido.

45 Específicamente, en el ensayo de bloqueo cruzado, la proteína IL-6R inmovilizada en los pocillos de una placa de microtitulación se incuba previamente en presencia o ausencia de una molécula de unión al antígeno competidora candidata, y después se le añade una molécula de unión al antígeno de ensayo. La cantidad de molécula de unión al antígeno de ensayo unida a la proteína IL-6R en los pocillos se correlaciona indirectamente con la capacidad de unión de una molécula de unión al antígeno competidora candidata que compite por la unión al mismo epítipo. Es decir, cuanto mayor es la afinidad de la molécula de unión al antígeno competidora por el mismo epítipo, menor es la actividad de unión de la molécula de unión al antígeno de ensayo hacia los pocillos recubiertos con proteína IL-6R.

50

La cantidad de la molécula de unión al antígeno de ensayo unida a los pocillos por la proteína IL-6R se puede determinar fácilmente marcando la molécula de unión al antígeno por adelantado. Por ejemplo, una molécula de unión al antígeno marcada con biotina se mide usando un conjugado de avidina/peroxidasa y un sustrato adecuado. En particular, el ensayo de bloqueo cruzado que usa marcadores enzimáticos tales como la peroxidasa se llama ensayo ELISA competitivo. La molécula de unión al antígeno también se puede marcar con otras sustancias marcadoras que permiten la detección o medición. Específicamente, se conocen radiomarcadores, marcadores fluorescentes y similares.

Cuando la molécula de unión al antígeno competidora candidata puede bloquear la unión por una molécula de unión al antígeno de ensayo que contiene un dominio de unión al antígeno de IL-6R en al menos 20%, preferiblemente al menos 20 a 50%, y más preferiblemente al menos 50% en comparación con la actividad de unión en un experimento de control realizado en ausencia del complejo de la molécula de unión al antígeno competidora, se determina que la molécula de unión al antígeno de ensayo se une sustancialmente al mismo epítipo al que se ha unido la molécula de unión al antígeno competidora, o compite por la unión al mismo epítipo.

Cuando ya se ha identificado la estructura de un epítipo que se ha unido a una molécula de unión al antígeno de ensayo que contiene un dominio de unión al antígeno de IL-6R, se puede evaluar si las moléculas de unión al antígeno de ensayo y control comparten un epítipo común comparando las actividades de unión de las dos moléculas de unión al antígeno hacia un péptido preparado mediante la introducción de mutaciones de aminoácidos en el péptido que forma el epítipo.

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

Alternativamente, cuando el epítipo identificado es un epítipo conformacional, se puede evaluar si las moléculas de unión al antígeno de ensayo y control comparten un epítipo común mediante el siguiente método. Primero, se preparan células que expresan IL-6R y células que expresan IL-6R con una mutación introducida en el epítipo. Las moléculas de unión al antígeno de ensayo y control se añaden a una suspensión celular preparada suspendiendo estas células en un tampón adecuado tal como PBS. Después, las suspensiones celulares se lavan adecuadamente con un tampón, y se les añade un anticuerpo marcado con FITC que reconoce las moléculas de unión al antígeno de ensayo y control. La intensidad de fluorescencia y el número de células teñidas con el anticuerpo marcado se determinan usando FACSCalibur (BD). Las moléculas de unión al antígeno de ensayo y control se diluyen adecuadamente usando un tampón adecuado, y se usan a las concentraciones deseadas. Por ejemplo, se pueden usar en una concentración dentro del intervalo de 10 µg/ml a 10 ng/ml. La intensidad de fluorescencia determinada por análisis usando el software CELL QUEST (BD), es decir, el valor de la media geométrica refleja la cantidad de anticuerpo marcado unido a las células. Es decir, las actividades de unión de las moléculas de unión al antígeno de ensayo y control, que están representadas por la cantidad de anticuerpo marcado unido, se pueden determinar midiendo el valor medio geométrico.

En el método anterior, se puede evaluar si una molécula de unión al antígeno "no se une sustancialmente a células que expresan IL-6R mutante", por ejemplo, mediante el siguiente método. Primero, las moléculas de unión al antígeno de ensayo y control unidas a las células que expresan IL-6R mutante se tiñen con un anticuerpo marcado. Después, se determina la intensidad de fluorescencia de las células. Cuando se usa FACSCalibur para la detección de fluorescencia por citometría de flujo, la intensidad de fluorescencia determinada se puede analizar usando el software CELL QUEST. A partir de los valores de la media geométrica en presencia y ausencia del complejo de polipéptido, se puede calcular el valor de comparación (Δ Media-Geo) de acuerdo con la siguiente fórmula para determinar la relación de aumento de la intensidad de fluorescencia como resultado de la unión de la molécula de unión al antígeno.

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

El valor de comparación de la media geométrica (Δ Valor Media-Geo para la molécula de IL-6R mutante) determinado por el análisis anterior, que refleja la cantidad de una molécula de unión al antígeno de ensayo unida a las células que expresan IL-6R mutante, se compara con el Δ Valor Media-Geo de comparación que refleja la cantidad de la molécula de unión al antígeno de ensayo unida a células que expresan IL-6R. En este caso, las concentraciones de la molécula de unión al antígeno de ensayo usada para determinar los valores de comparación de Δ Media-Geo para las células que expresan IL-6R y las células que expresan IL-6R mutante se ajustan de manera particularmente preferible para que sean iguales o sustancialmente iguales. Una molécula de unión al antígeno que se ha confirmado que reconoce un epítipo en IL-6R se usa como una molécula de unión al antígeno de control.

Si el valor de comparación de Δ Media-Geo de una molécula de unión al antígeno de ensayo para células que expresan IL-6R mutante es menor que el valor de comparación de Δ Media-Geo de la molécula de unión al antígeno de ensayo para células que expresan IL-6R en al menos un 80%, preferiblemente 50%, más preferiblemente 30%, y en particular

preferiblemente 15%, entonces la molécula de unión al antígeno de ensayo "no se une sustancialmente a células que expresan IL-6R mutante". La fórmula para determinar el valor de Media-Geo (Media geométrica) se describe en la Guía del usuario del software CELL QUEST (BD biosciences). Cuando la comparación muestra que los valores de comparación son sustancialmente equivalentes, se puede determinar que el epítipo para las moléculas de unión al antígeno de ensayo y control es el mismo.

Dominio de unión al antígeno

En el presente documento, un "dominio de unión al antígeno" puede tener cualquier estructura siempre que se una a un antígeno de interés. Dichos dominios incluyen preferiblemente, por ejemplo:

regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo;

- 10 un módulo de aproximadamente 35 aminoácidos llamado dominio A que está contenido en la proteína de membrana celular in vivo Avimer (documentos WO 2004/044011, WO 2005/040229);

Adnectina que contiene el dominio 10Fn3 que se une al resto de proteína de fibronectina, una glicoproteína expresada en la membrana celular (documento WO 2002/032925);

- 15 Affibody que está compuesto de un haz de tres hélices de 58 aminoácidos basado en el andamio del dominio de unión a IgG de la proteína A (documento WO 1995/001937);

proteínas de repetición anquirinas diseñadas (DARPs) que son una región expuesta en la superficie molecular de repeticiones de anquirinas (AR) que tienen una estructura en la que una subunidad que consiste en un giro que comprende 33 restos de aminoácidos, dos hélices antiparalelas y un bucle se apila repetidamente (documento WO 2002/020565);

- 20 Anticalinas y similares, que son dominios que consisten en cuatro bucles que soportan un lado de una estructura de barril compuesta por ocho cadenas antiparalelas dispuestas de forma circular que están altamente conservadas entre las moléculas de lipocalina, tales como la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL) (documento WO 2003/029462); y

- 25 la región cóncava formada por la estructura de láminas paralelas dentro de la estructura en forma de herradura constituida por repeticiones apiladas del módulo de repetición rica en leucina (LRR) del receptor de linfocitos variable (VLR) que no tiene la estructura de inmunoglobulina y se usa en el sistema de inmunidad adquirida en vertebrados sin mandíbula tales como lamprea y mixinos (documento WO 2008/016854). Los dominios de unión al antígeno preferidos de la presente descripción incluyen, por ejemplo, los que tienen regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo. Los ejemplos preferidos de dominios de unión al antígeno incluyen "cadena sencilla Fv (scFv)", "anticuerpo de cadena sencilla", "Fv", "cadena sencilla Fv 2 (scFv2)", "Fab" y "F(ab')₂".

- 30 Los dominios de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción se pueden unir a un epítipo idéntico. Dicho epítipo puede estar presente, por ejemplo, en una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Alternativamente, cada uno de los dominios de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción se pueden unir a un epítipo diferente. En la presente memoria, los diferentes epítipos pueden estar presentes, por ejemplo, en una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Específico

- 40 Con respecto a la unión de moléculas de unión al antígeno proporcionadas por la presente invención a un antígeno, el término "específico" significa que una de las moléculas a las que se une específicamente no se une sustancialmente a otras moléculas distintas de una o una pluralidad de su(s) molécula(s) de pareja de unión. En la presente memoria, "no se une sustancialmente" se refiere a mostrar 80% o menos, en general 50% o menos, preferiblemente 30% o menos y en particular preferiblemente 15% o menos actividad de unión a moléculas distintas de las moléculas parejas de unión en comparación con la actividad de unión hacia la(s) molécula(s) pareja(s), como se describe en la sección mencionada antes sobre la actividad de unión. Además, "específico" también se usa cuando un dominio de unión al antígeno es específico para un epítipo particular entre múltiples epítipos en un antígeno. Cuando un epítipo unido por un dominio de unión al antígeno está contenido en múltiples antígenos diferentes, las moléculas de unión al antígeno que contienen el dominio de unión al antígeno pueden unirse a varios antígenos que tienen el epítipo.

Actividad neutralizante

- 50 En una realización no limitante de la presente descripción, se proporciona una composición farmacéutica que comprende como un principio activo una molécula de unión al antígeno que tiene actividad neutralizante de antígeno, en donde la molécula de unión al antígeno comprende (i) un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones, (ii) un dominio de unión a FcγR que tiene actividad de unión selectiva a FcγRIIb, y (iii) un dominio de unión a FcRn que tiene actividad de unión a FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido. En general, la actividad neutralizante se refiere a la actividad de inhibir la

actividad biológica de un ligando, tal como virus y toxinas, que tienen actividad biológica en las células. Por lo tanto, las sustancias que tienen actividad neutralizante se refieren a sustancias que se unen al ligando o al receptor al que se une el ligando e inhiben la unión entre el ligando y el receptor. Los receptores bloqueados para la unión con el ligando por la actividad neutralizante no podrán presentar actividad biológica a través de este receptor. Cuando la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo, dicho anticuerpo que tiene actividad neutralizante generalmente se denomina anticuerpo neutralizante. La actividad neutralizante de una sustancia de ensayo se puede medir comparando la actividad biológica en presencia de un ligando entre cuando la sustancia de ensayo está presente y ausente.

Por ejemplo, los principales ligandos posibles para el receptor de IL-6 incluyen preferiblemente IL-6 como se muestra en la SEQ ID NO: 3. El receptor de IL-6, que es una proteína de membrana de tipo I con su extremo amino que forma el dominio extracelular, forma un heterotetrámero con un receptor gp130 que ha sido inducido a dimerizar por IL-6 (Heinrich et al. (*Biochem. J.* (1998) 334, 297-314)). La formación del heterotetrámero activa Jak, que está asociado con el receptor gp130. Jak sufre autofosforilación y fosforila el receptor. El sitio de fosforilación del receptor y Jak sirve como un sitio de unión para moléculas portadoras de SH2 que pertenecen a la familia Stat, tal como Stat3; MAP quinasa; PI3/Akt; y otras proteínas y adaptadores portadores de SH2. A continuación, Stat unido al receptor gp130 es fosforilado por Jack. El Stat fosforilado dimeriza y se mueve hacia el núcleo, y regula la transcripción de genes objetivo. Jak o Stat también pueden estar implicados en cascadas de señales a través de receptores de otras clases. Las cascadas de señales de IL-6 desreguladas se observan en la inflamación y afecciones patológicas de enfermedades autoinmunitarias y cánceres tales como cáncer de próstata y mieloma múltiple. Stat3 que puede actuar como un oncogén se activa constitutivamente en muchos tipos de cáncer. En el cáncer de próstata y el mieloma múltiple, hay una interferencia entre la cascada de señalización por el receptor de IL-6 y la cascada de señalización por los miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR) (Ishikawa et al. (*J. Clin. Exp. Hematopatol.* (2006) 46 (2), 55-66)).

Dichas cascadas de señalización intracelular son diferentes para cada tipo de célula; por lo tanto, se pueden determinar las moléculas objetivo adecuadas para cada célula objetivo de interés, y no se limitan a los factores mencionados anteriormente. La actividad de neutralización se puede evaluar midiendo la activación de la señalización in vivo. Además, la activación de la señalización in vivo se puede detectar usando como índice la acción de inducir la transcripción de un gen diana que existe corriente abajo de la cascada de señalización in vivo. El cambio en la actividad de transcripción del gen objetivo se puede detectar por el principio de los ensayos de indicadores. Específicamente, un gen indicador tal como la proteína verde fluorescente (GFP) o la luciferasa se sitúa corriente abajo de una región promotora o un factor de transcripción del gen objetivo, se mide su actividad indicadora y, por lo tanto, el cambio en la actividad de transcripción se puede medir como la actividad de indicador. Se pueden usar adecuadamente kits disponibles en el mercado para medir la activación de la señalización in vivo (por ejemplo, Mercury Pathway Profiling Luciferase System (Clontech)).

Además, para los métodos de medición de la actividad de los receptores/ligandos neutralizantes de la familia de receptores EGF y similares, que normalmente actúan sobre las cascadas de señalización que trabajan para promover la proliferación celular, la actividad de neutralización de las moléculas de unión al antígeno se puede evaluar midiendo la actividad de proliferación de células objetivo. Por ejemplo, cuando las células son promovidas para proliferar por factores de crecimiento de la familia EGF tales como HB-EGF, el efecto inhibitorio en la proliferación de dichas células basado en la actividad neutralizante de un anticuerpo anti-HB-EGF se puede evaluar o medir adecuadamente mediante los siguientes métodos: Para evaluar o medir la actividad inhibitoria de la proliferación celular in vitro, se usa un método para medir la incorporación de timidina marcada con [³H] añadida al medio por células viables como índice de capacidad de replicación de ADN. Como métodos más convenientes, se usan un método de exclusión de colorante, en el que se mide la capacidad de una célula para excluir un colorante tal como el azul de trypan de la célula bajo el microscopio, y el método MTT. El último método usa la capacidad de las células viables para convertir el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio), que es una sal de tetrazolio, en un producto de formazán azul. Más específicamente, se añade un anticuerpo de ensayo, así como un ligando a la solución de cultivo de una célula de ensayo, y después de un cierto periodo de tiempo, se añade la solución de MTT a la solución de cultivo, y esta se deja reposar durante algún tiempo para la incorporación del MTT en la célula. Como resultado, el MTT, que es un compuesto amarillo, se convierte en un compuesto azul por la acción de la succinato deshidrogenasa en las mitocondrias de la célula. Después de disolver este producto azul para la coloración, se mide su absorbancia y se usa como un índice para el número de células viables. Además de MTT, reactivos tales como MTS, XTT, WST-1 y WST-8 también están disponibles en el mercado (Nacalai Tesque, y similares) y se pueden usar adecuadamente. Para medir la actividad, un anticuerpo de unión que es del mismo isotipo que el anticuerpo anti-HB-EGF pero que no tiene la actividad inhibitoria de la proliferación celular se puede usar como un anticuerpo de control de la misma manera que el anticuerpo anti-HB-EGF, y la actividad se puede determinar cuando el anticuerpo anti-HB-EGF muestra una actividad inhibitoria de la proliferación celular más fuerte que el anticuerpo de control.

Las células que se pueden usar preferiblemente para evaluar la actividad incluyen, por ejemplo, células promovidas para proliferar por HB-EGF, tales como la línea celular de cáncer de ovario RMG-1, y células Ba/F3 de ratón que han sido transformadas por un vector para expresar un gen que codifica hEGFR/mG-CSFR, que es una proteína de fusión en la que el dominio extracelular del EGFR humano se fusiona en el marco con el dominio intracelular del receptor G-CSF de ratón. De esta manera, los expertos en la técnica pueden seleccionar adecuadamente las células para usarlas para evaluar la actividad y usarlas para medir la actividad de proliferación celular como se mencionó anteriormente.

Anticuerpo

En la presente memoria, "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina natural o una inmunoglobulina producida por síntesis parcial o completa. Los anticuerpos se pueden aislar de fuentes naturales tales como plasma y suero de origen natural, o líquidos sobrenadantes de cultivo de hibridomas productores de anticuerpos. Alternativamente, los anticuerpos se pueden sintetizar parcial o completamente usando técnicas tales como la recombinación genética. Los anticuerpos preferidos incluyen, por ejemplo, anticuerpos de un isotipo de inmunoglobulina o subclase que pertenece al mismo. Las inmunoglobulinas humanas conocidas incluyen anticuerpos de las siguientes nueve clases (isotipos): IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE e IgM. De estos isotipos, los anticuerpos de la presente invención incluyen IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Se describe una serie de secuencias de alotipos de regiones constantes de IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana e IgG4 humana debido a polimorfismos de genes en "Sequences of proteins of immunological interest", Publicación NIH Nº 91-3242. Se puede usar cualquiera de dichas secuencias en la presente invención. En particular, para la secuencia de IgG1 humana, la secuencia de aminoácidos en las posiciones 356 a 358 como se indica por la numeración EU puede ser DEL o EEM. Se han descrito varias secuencias de alotipos debidos a polimorfismos genéticos en "Sequences of proteins of immunological interest", Publicación NIH Nº 91-3242 para la región constante de Igκ (Kappa) humana y la región constante de Igλ (Lambda) humana, y se puede usar cualquiera de las secuencias en la presente invención.

Los expertos en la técnica conocen métodos para producir un anticuerpo con la actividad de unión deseada. A continuación se da un ejemplo que describe un método para producir un anticuerpo que se une a IL-6R (anticuerpo anti-IL-6R). Los anticuerpos que se unen a un antígeno distinto de IL-6R también se pueden producir de acuerdo con el ejemplo que se describe a continuación.

Los anticuerpos anti-IL-6R se pueden obtener como anticuerpos policlonales o monoclonales usando métodos conocidos. Los anticuerpos anti-IL-6R producidos preferiblemente son anticuerpos monoclonales derivados de mamíferos. Dichos anticuerpos monoclonales derivados de mamíferos incluyen anticuerpos producidos por hibridomas o células hospedantes transformadas con un vector de expresión que porta un gen de anticuerpo mediante técnicas de ingeniería genética. Los "anticuerpos humanizados" o los "anticuerpos quiméricos" están incluidos en los anticuerpos monoclonales de la presente descripción.

Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales se pueden producir usando técnicas conocidas, por ejemplo, como se describe a continuación. Específicamente, se inmunizan mamíferos por métodos de inmunización convencionales usando una proteína IL-6R como antígeno sensibilizante. Las células inmunes resultantes se fusionan con células parentales conocidas mediante métodos convencionales de fusión celular. Después, los hibridomas que producen un anticuerpo anti-IL-6R se pueden seleccionar mediante la detección de células productoras de anticuerpos monoclonales usando métodos de detección convencionales.

Específicamente, los anticuerpos monoclonales se preparan como se menciona a continuación. Primero, se puede expresar el gen de IL-6R cuya secuencia de nucleótidos se describe en la SEQ ID NO: 2 para producir una proteína IL-6R que se muestra en la SEQ ID NO: 1, que se usará como un antígeno sensibilizante para la preparación de anticuerpos. Es decir, se inserta una secuencia génica que codifica IL-6R en un vector de expresión conocido, y las células hospedantes adecuadas se transforman con este vector. La proteína IL-6R humana deseada se purifica de las células hospedantes o de sus líquidos sobrenadantes de cultivo por métodos conocidos. Con el fin de obtener IL-6R soluble de los líquidos sobrenadantes de cultivo, por ejemplo, se expresa una proteína que consiste en los aminoácidos en las posiciones 1 a 357 en la secuencia de polipéptido de IL-6R de SEQ ID NO: 1, tal como se describe en Mullberg et al. (*J. Immunol.* (1994) 152 (10), 4958-4968), como una IL-6R soluble, en lugar de la proteína IL-6R de SEQ ID NO: 1. La proteína IL-6R nativa purificada también se puede usar como antígeno sensibilizante.

La proteína IL-6R purificada se puede usar como antígeno sensibilizante para la inmunización de mamíferos. También se puede usar un péptido parcial de IL-6R como un antígeno sensibilizante. En este caso, se puede preparar un péptido parcial por síntesis química basada en la secuencia de aminoácidos de IL-6R humana, o insertando un gen de IL-6R parcial en un vector de expresión para la expresión. Alternativamente, se puede producir un péptido parcial por degradación de una proteína IL-6R con una proteasa. La longitud y la región del péptido parcial de IL-6R no se limitan a realizaciones particulares. Se puede seleccionar arbitrariamente una región preferida de la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos 20 a 357 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. El número de aminoácidos que forman un péptido para usar como un antígeno sensibilizante es preferiblemente al menos cinco o más, seis o más, o siete o más. Más específicamente, se puede usar un péptido de 8 a 50 restos, más preferiblemente de 10 a 30 restos como un antígeno sensibilizante.

Para el antígeno sensibilizante, alternativamente, se puede usar una proteína de fusión preparada fusionando un polipéptido o péptido parcial deseado de la proteína IL-6R con un polipéptido diferente. Por ejemplo, se usan preferiblemente fragmentos de anticuerpo Fc y marcadores peptídicos para producir proteínas de fusión para usar como antígenos sensibilizantes. Los vectores para la expresión de dichas proteínas de fusión se pueden construir fusionando en el marco genes que codifican dos o más fragmentos de polipéptidos deseados e insertando el gen de fusión en un vector de expresión como se ha descrito antes. Los métodos para producir proteínas de fusión se describen en Molecular Cloning 2ª ed. (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2ª ed., 9.47-9.58 (1989) Cold Spring Harbor Lab. Prensa). Los métodos para preparar IL-6R para usar como un antígeno sensibilizante, y los métodos de

inmunización que usan IL-6R se describen específicamente en los documentos WO 2003/000883, WO 2004/022754, WO 2006/006693 y similares.

5 No hay una limitación particular en los mamíferos que se van a inmunizar con el antígeno sensibilizante. Sin embargo, es preferible seleccionar los mamíferos considerando su compatibilidad con las células parentales que se usarán para la fusión celular. En general, se usan preferiblemente roedores tales como ratones, ratas y hámsteres, conejos y monos.

10 Los animales anteriores se inmunizan con un antígeno sensibilizante mediante métodos conocidos. Los métodos de inmunización llevados a cabo generalmente incluyen, por ejemplo, inyección intraperitoneal o subcutánea de un antígeno sensibilizante en mamíferos. Específicamente, un antígeno sensibilizante se diluye adecuadamente con PBS (solución salina tamponada con fosfato), solución salina fisiológica o similares. Si se desea, se mezcla un adyuvante convencional tal como el adyuvante completo de Freund con el antígeno, y se emulsiona la mezcla. Después, el antígeno sensibilizante se administra a un mamífero varias veces en intervalos de 4 a 21 días. Se pueden usar portadores adecuados en la inmunización con el antígeno sensibilizante. En particular, cuando se usa un péptido parcial de bajo peso molecular como el antígeno sensibilizante, a veces es deseable acoplar el péptido antígeno sensibilizante a una proteína transportadora tal como albúmina o hemocianina de lapa californiana para la inmunización.

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

- se puede proporcionar inmunoestimulación a la vez que se retiene la estructura de una proteína de membrana tal como IL-6R; y
- 25 - no hay necesidad de purificar el antígeno para la inmunización.

Con el fin de preparar un anticuerpo monoclonal de la presente descripción usando inmunización con ADN, primero, se administra un ADN que expresa una proteína IL-6R a un animal que se va a inmunizar. El ADN que codifica IL-6R se puede sintetizar por métodos conocidos como PCR. El ADN obtenido se inserta en un vector de expresión adecuado, y después se administra a un animal que se va a inmunizar. Los vectores de expresión usados preferiblemente incluyen, por ejemplo, vectores de expresión disponibles en el mercado tales como pcDNA3.1. Los vectores se pueden administrar a un organismo usando métodos convencionales. Por ejemplo, la inmunización con ADN se lleva a cabo usando una pistola de genes para introducir partículas de oro recubiertas con vector de expresión en las células del cuerpo de un animal que se va a inmunizar. Los anticuerpos que reconocieron IL-6R también se pueden producir por los métodos descritos en el documento WO 2003/104453.

35 Después de inmunizar a un mamífero como se ha descrito antes, se confirma un aumento en el título de un anticuerpo de unión a IL-6R en el suero. Después, se recogen las células inmunitarias del mamífero y después se someten a fusión celular. En particular, se usan preferiblemente esplenocitos como células inmunitarias.

40 Se usa una célula de mieloma de mamífero como una célula para ser fusionada con las células inmunitarias mencionadas antes. Las células de mieloma comprenden preferiblemente un marcador de selección adecuado para el cribado. Un marcador de selección confiere características a las células para su supervivencia (o muerte) en unas condiciones de cultivo específicas. La deficiencia de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (en lo sucesivo abreviado como deficiencia de HGPRT) y la deficiencia de timidina quinasa (en lo sucesivo abreviado como deficiencia de TK) se conocen como marcadores de selección. Las células con deficiencia de HGPRT o TK tienen sensibilidad a la hipoxantina-aminopterina-timidina (en lo sucesivo abreviado como sensibilidad a HAT). Las células sensibles a HAT no pueden sintetizar ADN en un medio de selección de HAT y, por lo tanto, son destruidas. Sin embargo, cuando las células se fusionan con células normales, pueden continuar la síntesis de ADN usando la ruta de recuperación de las células normales y, por lo tanto, pueden crecer incluso en el medio de selección de HAT.

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

55 Por ejemplo, se pueden usar preferiblemente las células de mieloma que incluyen las siguientes células:

P3(P3x63Ag8.653) (*J. Immunol.* (1979) 123 (4), 1548-1550);

P3x63Ag8U.1 (*Current Topics in Microbiology and Immunology* (1978)81, 1-7);

NS-1 (*C. Eur. J. Immunol.* (1976)6 (7), 511-519);

MPC-11 (*Cell* (1976) 8 (3), 405-415);

SP2/0 (*Nature* (1978) 276 (5685), 269-270);

5 FO (*J. Immunol. Methods* (1980) 35 (1-2), 1-21);

S194/5.XX0.BU.1 (*J. Exp. Med.* (1978) 148 (1), 313-323);

R210 (*Nature* (1979) 277 (5692), 131-133), etc.

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

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

15 La proporción de células inmunitarias a células de mieloma se puede determinar a su propia discreción, preferiblemente, por ejemplo, una célula de mieloma por cada uno a diez inmunocitos. Los medios de cultivo que se van a usar para las fusiones celulares incluyen, por ejemplo, medios que son adecuados para el crecimiento de líneas celulares de mieloma, tales como el medio RPMI1640 y el medio MEM, y otro medio de cultivo convencional usado para este tipo de cultivo celular. Además, se pueden añadir preferiblemente al medio de cultivo suplementos de suero tales como el suero de ternera fetal (FCS).

20 Para la fusión celular, se mezclan bien cantidades predeterminadas de las células inmunitarias y las células de mieloma anteriores en el medio de cultivo anterior. Después, se añade una solución de PEG (por ejemplo, el peso molecular medio es de aproximadamente 1 000 a 6 000) precalentada a aproximadamente 37°C en una concentración en general de 30% a 60% (p/v). Esto se mezcla suavemente para producir las células de fusión deseadas (hibridomas). Después, se añade gradualmente un medio de cultivo adecuado mencionado antes, a las células, y esto se centrifuga
25 repetidamente para eliminar el líquido sobrenadante. Por lo tanto, los agentes de fusión celular y aquellos que son desfavorables para el crecimiento del hibridoma se pueden eliminar.

Los hibridomas así obtenidos se pueden seleccionar mediante cultivo usando un medio selectivo convencional, por ejemplo, medio de HAT (un medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). Las células que no sean los hibridomas deseados (células no fusionadas) se pueden destruir mediante el cultivo continuo en el medio de
30 HAT anterior durante un periodo de tiempo suficiente (típicamente, el periodo es de varios días a varias semanas). Después, los hibridomas que producen el anticuerpo deseado se criban y clonan individualmente por métodos de dilución limitante convencionales.

Los hibridomas así obtenidos se pueden seleccionar usando un medio de selección basado en el marcador de selección que posee el mieloma usado para la fusión celular. Por ejemplo, las células deficientes en HGPRT o TK se
35 pueden seleccionar por cultivo usando el medio de HAT (un medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). Específicamente, cuando se usan células de mieloma sensibles a HAT para la fusión celular, las células fusionadas con éxito con células normales pueden proliferar selectivamente en el medio HAT. Las células que no sean los hibridomas deseados (células no fusionadas) se pueden destruir mediante el cultivo continuo en el medio de HAT anterior durante un periodo de tiempo suficiente. Específicamente, los hibridomas deseados se pueden seleccionar
40 por cultivo durante generalmente varios días a varias semanas. Después, los hibridomas que producen el anticuerpo deseado se criban y se clonan individualmente por métodos de dilución limitante convencionales.

Los anticuerpos deseados preferiblemente se pueden seleccionar y clonar individualmente por métodos de cribado basados en una reacción antígeno/anticuerpo conocida. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de unión a IL-6R se
45 puede unir a IL-6R expresado en la superficie celular. Dicho anticuerpo monoclonal se puede cribar por separación de células activadas por fluorescencia (FACS). FACS es un sistema que evalúa la unión de un anticuerpo a la superficie celular analizando las células en contacto con un anticuerpo fluorescente usando un rayo láser y midiendo la fluorescencia emitida por las células individuales.

Para cribar hibridomas que producen un anticuerpo monoclonal de la presente descripción por FACS, primero se preparan células que expresan IL-6R. Las células que se usan preferiblemente para el cribado son células de mamífero
50 en las que IL-6R se expresa de forma forzada. Como control, se puede detectar selectivamente la actividad de un anticuerpo para unirse a IL-6R de la superficie celular usando células de mamífero no transformadas como células hospedantes. Específicamente, los hibridomas que producen un anticuerpo monoclonal anti-IL-6R se pueden aislar seleccionando hibridomas que producen un anticuerpo que se une a las células forzadas a expresar IL-6R, pero no a las células hospedantes.

- Alternativamente, la actividad de un anticuerpo para unirse a células que expresan IL-6R inmovilizadas se puede evaluar basándose en el principio de ELISA. Por ejemplo, las células que expresan IL-6R se inmovilizan en los pocillos de una placa ELISA. Los líquidos sobrenadantes de cultivo de hibridomas se ponen en contacto con las células inmovilizadas en los pocillos, y se detectan los anticuerpos que se unen a las células inmovilizadas. Cuando los anticuerpos monoclonales se obtienen de ratón, los anticuerpos unidos a las células se pueden detectar usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón. Los hibridomas que producen un anticuerpo deseado que tiene la capacidad de unión al antígeno se seleccionan mediante el cribado anterior, y se pueden clonar por un método de dilución limitante o similar.
- Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales así preparados se pueden someter a pases en un medio de cultivo convencional y almacenar en nitrógeno líquido durante un periodo prolongado.
- Los hibridomas anteriores se cultivan por un método convencional, y los anticuerpos monoclonales deseados se pueden preparar a partir de los líquidos sobrenadantes del cultivo. Alternativamente, los hibridomas se administran y crecen en mamíferos compatibles, y los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de la ascitis. El primer método es adecuado para preparar anticuerpos con alta pureza.
- Los anticuerpos codificados por genes de anticuerpos que se clonan a partir de células productoras de anticuerpos tales como los hibridomas anteriores también se pueden usar preferiblemente. Se inserta un gen de anticuerpo clonado en un vector adecuado, y este se introduce en un hospedante para expresar el anticuerpo codificado por el gen. Los métodos para aislar genes de anticuerpos, insertar los genes en vectores y transformar células hospedantes ya han sido establecidos, por ejemplo, por Vandamme et al. (*EUR. J. Biochem.* (1990) 192(3), 767-775). También se conocen métodos para producir anticuerpos recombinantes como se describe a continuación.
- Por ejemplo, un ADNc que codifica la región variable (región V) de un anticuerpo anti-IL-6R se prepara a partir de células de hibridoma que expresan el anticuerpo anti-IL-6R. Para este propósito, primero se extrae el ARN total de los hibridomas. Los métodos usados para extraer el ARNm de las células incluyen, por ejemplo:
- el método de ultracentrifugación de guanidina (*Biochemistry* (1979) 18 (24), 5294-5299) y
 - el método AGPC (*Anal. Biochem.* (1987) 162(1), 156-159)
- Los ARNm extraídos se pueden purificar usando el kit de purificación de ARNm (GE Healthcare Bioscience) o similar. Alternativamente, los kits para extraer el ARNm total directamente de las células, tales como el kit de purificación de ARNm QuickPrep (GE Healthcare Bioscience), también están disponibles en el mercado. Los ARNm se pueden preparar a partir de hibridomas usando dichos kits. Los ADNc que codifican la región V del anticuerpo se pueden sintetizar a partir de los ARNm preparados usando una transcriptasa inversa. Los ADNc se pueden sintetizar usando el kit de síntesis de ADNc de primera cadena de transcriptasa inversa AMV (Seikagaku Co.) o similar. Además, se pueden usar adecuadamente el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech) y el método 5'-RACE basado en PCR (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1988) 85 (23), 8998-9002; *Nucleic Acids Res.* (1989) 17 (8), 2919-2932) para sintetizar y amplificar ADNc. En dicho procedimiento de síntesis de ADNc, se pueden introducir los sitios de enzimas de restricción adecuados descritos a continuación en ambos extremos de un ADNc.
- El fragmento de ADNc de interés se purifica del producto de la PCR resultante, y después este se liga a un vector de ADN. Se construye así un vector recombinante y se introduce en *E. coli* o similar. Después de la selección de colonias, se puede preparar el vector recombinante deseado a partir de *E. coli* formadora de colonias. Después, se analiza si el vector recombinante tiene la secuencia de nucleótidos de ADNc de interés por un método conocido tal como el método de terminación de la cadena de nucleótidos didesoxi.
- El método 5'-RACE que usa cebadores para amplificar el gen de la región variable se usa convenientemente para aislar el gen que codifica la región variable. Primero, se construye una biblioteca de ADNc 5'-RACE por síntesis de ADNc usando ARN extraídos de células de hibridoma como molde. Un kit disponible en el mercado, como el Kit de amplificación de ADNc SMART RACE, se usa de manera adecuada para sintetizar la biblioteca de ADNc 5'-RACE.
- El gen del anticuerpo se amplifica por PCR usando la biblioteca de ADNc 5'-RACE preparada como molde. Los cebadores para amplificar el gen de anticuerpo de ratón se pueden diseñar basándose en secuencias conocidas de genes de anticuerpos. Las secuencias de nucleótidos de los cebadores varían dependiendo de la subclase de inmunoglobulina. Por lo tanto, es preferible que la subclase se determine de antemano usando un kit disponible en el mercado, tal como el kit de isotipado de anticuerpos monoclonales de ratón Iso Strip (Roche Diagnostics).
- Específicamente, por ejemplo, los cebadores que permiten la amplificación de genes que codifican las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$ y $\gamma 3$ y las cadenas ligeras κ y λ se usan para aislar genes que codifican la IgG de ratón. En general, un cebador que se reasocia con un sitio de la región constante cerca de la región variable se usa como cebador del lado 3' para amplificar un gen de la región variable de IgG. Mientras tanto, se usa un cebador unido a un kit de construcción de biblioteca de ADNc 5' RACE como cebador del lado 5'.
- Los productos de la PCR así amplificados se usan para reformar inmunoglobulinas compuestas de una combinación de cadenas pesadas y ligeras. Se puede seleccionar un anticuerpo deseado usando la actividad de unión a IL-6R de

una inmunoglobulina reformada como indicador. Por ejemplo, cuando el objetivo es aislar un anticuerpo contra IL-6R, es más preferible que la unión del anticuerpo a IL-6R sea específica. Un anticuerpo de unión a IL-6R se puede cribar, por ejemplo, mediante las siguientes etapas:

- 5 (1) poner en contacto una célula que expresa IL-6R con un anticuerpo que comprende la región V codificada por un ADNc aislado de un hibridoma;
- (2) detectar la unión del anticuerpo a la célula que expresa IL-6R; y
- (3) seleccionar un anticuerpo que se une a la célula que expresa IL-6R.

10 Se conocen métodos para detectar la unión de un anticuerpo a células que expresan IL-6R. Específicamente, la unión de un anticuerpo a células que expresan IL-6R se puede detectar por las técnicas descritas anteriormente, tales como FACS. Las muestras inmovilizadas de células que expresan IL-6R se usan adecuadamente para evaluar la actividad de unión de un anticuerpo.

15 Los métodos de cribado de anticuerpos preferidos que usan la actividad de unión como indicador también incluyen métodos de selección por pasos que usan vectores de fagos. Los métodos de cribado que usan vectores de fagos son ventajosos cuando los genes de anticuerpos se aíslan de bibliotecas de subclases de cadena pesada y cadena ligera de una población celular que expresa anticuerpos policlonales. Los genes que codifican las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera se pueden unir por una secuencia de conector adecuado para formar un Fv de cadena sencilla (scFv). Los fagos que presentan scFv en su superficie se pueden producir insertando un gen que codifica scFv en un vector de fago. Los fagos se ponen en contacto con un antígeno de interés. Después, se puede aislar un ADN que codifica scFv que tiene la actividad de unión de interés recogiendo fagos unidos al antígeno. Este proceso se puede repetir según sea necesario para enriquecer en scFv que tenga la actividad de unión de interés.

20 Después de aislar el ADNc que codifica la región V del anticuerpo anti-IL-6R de interés, el ADNc se digiere con enzimas de restricción que reconocen los sitios de restricción introducidos en ambos extremos del ADNc. Las enzimas de restricción preferidas reconocen y escinden una secuencia de nucleótidos que ocurre en la secuencia de nucleótidos del gen del anticuerpo con baja frecuencia. Además, se introduce preferiblemente un sitio de restricción para una enzima que produce un extremo cohesivo en un vector para insertar un fragmento digerido de copia única en la orientación correcta. El ADNc que codifica la región V del anticuerpo anti-IL-6R es digerido como se ha descrito antes, y este se inserta en un vector de expresión adecuado para construir un vector de expresión del anticuerpo. En este caso, si un gen que codifica la región constante del anticuerpo (región C) y un gen que codifica la región V anterior se fusionan en el marco, se obtiene un anticuerpo quimérico. En la presente memoria, "anticuerpo quimérico" significa que el origen de la región constante es diferente del de la región variable. Por lo tanto, además de los anticuerpos heteroquímicos humano-ratón, los anticuerpos aloquímicos humano-humano están incluidos en los anticuerpos químicos de la presente descripción. Se puede construir un vector de expresión de anticuerpos químicos insertando el gen de la región V anterior en un vector de expresión que ya tiene la región constante. Específicamente, por ejemplo, una secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción que escinde el gen de la región V anterior se puede colocar adecuadamente en el lado 5' de un vector de expresión que lleva un ADN que codifica una región constante del anticuerpo deseado. Se construye un vector de expresión de anticuerpos químicos fusionando en marco los dos genes digeridos con la misma combinación de enzimas de restricción.

35 Para producir un anticuerpo monoclonal anti-IL-6R, se insertan genes de anticuerpos en un vector de expresión de modo que los genes son expresados bajo el control de una región reguladora de la expresión. La región reguladora de la expresión para la expresión de anticuerpos incluye, por ejemplo, potenciadores y promotores. Además, se puede unir una secuencia señal adecuada al extremo amino de modo que el anticuerpo expresado sea secretado al exterior de las células. En los ejemplos descritos más adelante, se usa un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos MGWSCILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 4) como secuencia señal. Por otro lado, se pueden unir otras secuencias de señal adecuadas. El polipéptido expresado se escinde en el extremo carboxilo de la secuencia anterior, y el polipéptido resultante es secretado al exterior de las células como un polipéptido maduro. Después, las células hospedantes adecuadas se transforman con el vector de expresión, y se obtienen células recombinantes que expresan el ADN que codifica el anticuerpo anti-IL-6R.

40 Los ADN que codifican la cadena pesada (cadena H) y la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo se insertan por separado en diferentes vectores de expresión para expresar el gen del anticuerpo. Una molécula de anticuerpo que tiene las cadenas H y L se puede expresar cotransfectando la misma célula hospedante con vectores en los que se insertan respectivamente los genes de la cadena H y la cadena L. Alternativamente, las células hospedantes se pueden transformar con un único vector de expresión en el que se insertan los ADN que codifican las cadenas H y L (véase el documento WO 1994/011523).

55 Existen varias combinaciones de célula hospedante/vector de expresión conocidas para la preparación de anticuerpos mediante la introducción de genes de anticuerpos aislados en los hospedantes apropiados. Todos estos sistemas de expresión son aplicables al aislamiento de los dominios de unión al antígeno de la presente descripción. Las células eucariotas adecuadas usadas como células hospedantes incluyen células animales, células vegetales y células fúngicas. Específicamente, las células animales incluyen, por ejemplo, las siguientes células.

(1) Células de mamífero: CHO (línea celular de ovario de hámster chino), COS (línea celular de riñón de mono), mieloma (Sp2/O, NS0 y similares), BHK (línea celular de riñón de hámster recién nacido), Hela, Vero, HEK293 (línea celular de riñón embrionario humano con ADN de adenovirus (Ad)5 cortado), Freestyle293, célula PER.C6 (línea celular de retina embrionaria humana transformada con los genes de adenovirus tipo 5 (Ad5) E1A y E1B), y similares (Current Protocols in Protein Science (Mayo de 2001, Unidad 5.9, Tabla 5.9.1));

(2) Células anfibias: ovocitos de *Xenopus*, o similares; y

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

Además, como célula vegetal, se conoce un sistema de expresión génica de anticuerpos que usa células derivadas del género *Nicotiana* tal como *Nicotiana tabacum*. Las células cultivadas de callos se pueden usar adecuadamente para transformar células vegetales.

Además, se pueden usar las siguientes células como células fúngicas:

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

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

Además, también se conocen sistemas de expresión de genes de anticuerpos que usan células procariotas. Por ejemplo, cuando se usan células bacterianas, se pueden usar adecuadamente células de *E. coli*, células de *Bacillus subtilis* y similares en la presente descripción. Los vectores de expresión que portan los genes de anticuerpos de interés se introducen en estas células por transfección. Las células transfectadas se cultivan in vitro, y se puede preparar el anticuerpo deseado a partir del cultivo de células transformadas.

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

Cuando una molécula de unión al antígeno descrita en la presente memoria se administra a seres humanos, un dominio de unión al antígeno derivado de un anticuerpo genéticamente recombinante que se ha modificado artificialmente para reducir la antigenicidad heteróloga contra seres humanos y similares, se puede usar de manera adecuada como el dominio de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno. Dichos anticuerpos genéticamente recombinantes incluyen, por ejemplo, anticuerpos humanizados. Estos anticuerpos modificados se producen de manera adecuada por métodos conocidos.

Una región variable de anticuerpo usada para producir el dominio de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno descrita en la presente memoria en general está formada por tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que están separadas por cuatro regiones armazón (FR). La CDR es una región que determina sustancialmente la especificidad de unión de un anticuerpo. Las secuencias de aminoácidos de las CDR son muy diversas. Por otro lado, las secuencias de aminoácidos que forman la FR a menudo tienen una alta identidad incluso entre anticuerpos con diferentes especificidades de unión. Por lo tanto, en general, la especificidad de unión de un determinado anticuerpo se puede introducir en otro anticuerpo mediante injerto de CDR.

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

Las secuencias de nucleótidos que se van a ligar están diseñadas de modo que se conectarán entre sí en el marco. Las FR humanas se sintetizan individualmente usando los respectivos cebadores. Como resultado, se obtienen productos en los que el ADN que codifica la CDR de ratón está unido a los ADN que codifican FR individuales. Las

secuencias de nucleótidos que codifican la CDR de ratón de cada producto están diseñadas de modo que se solapan entre sí. Después, se lleva a cabo una reacción de síntesis de cadena complementaria para reasociar las regiones de CDR que se solapan de los productos sintetizados usando un gen de anticuerpo humano como molde. Las FR humanas se ligan a través de las secuencias de CDR de ratón mediante esta reacción.

- 5 El gen de la región V de longitud completa, en el que finalmente se ligan tres CDR y cuatro FR, se amplifica usando cebadores que se reasocian a su extremo 5' o 3', que se añaden con secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción adecuadas. Se puede producir un vector de expresión para anticuerpos humanizados insertando el ADN obtenido como se ha descrito antes y un ADN que codifica una región C de anticuerpo humano en un vector de expresión de modo que se unan en el marco. Después de que el vector recombinante se transfecta en un hospedante para establecer células recombinantes, las células recombinantes se cultivan, y el ADN que codifica el anticuerpo humanizado se expresa para producir el anticuerpo humanizado en el cultivo celular (véase, Publicación de Patente Europea N^o EP 239400 y publicación de patente internacional N^o WO 1996/002576).

- 15 Mediante la medición cualitativa o cuantitativa y evaluación de la actividad de unión al antígeno del anticuerpo humanizado producido como se ha descrito antes, se pueden seleccionar adecuadamente las FR de anticuerpos humanos que permiten que las CDR formen un sitio favorable de unión al antígeno cuando se ligan a través de las CDR. Los restos de aminoácidos en las FR pueden sustituirse según sea necesario, de modo que las CDR de un anticuerpo humano reformado formen un sitio de unión al antígeno adecuado. Por ejemplo, se pueden introducir mutaciones en la secuencia de aminoácidos en las FR aplicando el método de PCR usado para injertar una CDR de ratón en una FR humana. Más específicamente, las mutaciones en la secuencia de nucleótidos parciales se pueden introducir en cebadores que se reasocian a la FR. Las mutaciones en la secuencia de nucleótidos se introducen en las FR sintetizadas usando dichos cebadores. Las secuencias de FR mutantes que tienen las características deseadas se pueden seleccionar midiendo y evaluando la actividad del anticuerpo mutante con sustitución de aminoácidos para unirse al antígeno por el método mencionado antes (*Cancer Res.* (1993) 53: 851-856).

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

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

- Además de las técnicas descritas antes, se pueden usar adecuadamente técnicas de clonación de células B (identificación de cada secuencia que codifica el anticuerpo, clonación y su aislamiento; uso en la construcción del vector de expresión para preparar cada anticuerpo (IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 en particular); y similares) tal como se describe en Bernasconi et al. (*Science* (2002) 298: 2199-2202) o en el documento WO 2008/081008, para aislar genes de anticuerpos.

Sistema de numeración EU y sistema de numeración Kabat

- 45 De acuerdo con los métodos usados en la presente descripción, las posiciones de aminoácidos asignadas a las CDR y FR de anticuerpos se especifican de acuerdo con la numeración de Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md., 1987 y 1991)). En la presente memoria, cuando una molécula de unión al antígeno es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, los aminoácidos de la región variable se indican de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat, mientras que los aminoácidos de la región constante se indican de acuerdo con el sistema de numeración EU basado en las posiciones de aminoácidos de Kabat.

- 50 Condiciones de concentración de iones

Condiciones de concentración de iones metálicos

- En una realización de la presente descripción, la concentración de iones se refiere a una concentración de iones metálicos. Los "iones metálicos" se refieren a iones de elementos del grupo I, excepto hidrógeno, tales como metales alcalinos y elementos del grupo del cobre, elementos del grupo II, tales como metales alcalinotérreos y elementos del grupo del cinc, elementos del grupo III excepto boro, elementos del grupo IV excepto carbono y silicio, elementos del grupo VIII tales como elementos del grupo del hierro y del platino, elementos que pertenecen al subgrupo A de los grupos V, VI y VII, y elementos metálicos tales como antimonio, bismuto y polonio. Los átomos metálicos tienen la propiedad de liberar electrones de valencia para convertirse en cationes. Esto se denomina tendencia a la ionización.

Los metales con fuerte tendencia a la ionización se considera que son químicamente activos.

En la presente descripción, los iones metálicos preferidos incluyen, por ejemplo, ion calcio. El ion calcio está implicado en la modulación de muchos fenómenos biológicos, que incluyen la contracción de músculos tales como los músculos esqueléticos, lisos y cardíacos; activación del movimiento, fagocitosis y similares de leucocitos; activación de cambio de forma, secreción y similares de las plaquetas; activación de linfocitos; activación de mastocitos, incluyendo la secreción de histamina; respuestas celulares mediadas por el receptor de catecolamina α o el receptor de acetilcolina; exocitosis; liberación de sustancias transmisoras de terminales neuronales; y flujo axoplásmico en neuronas. Los receptores de iones de calcio intracelulares conocidos incluyen troponina C, calmodulina, parvalbúmina y cadena ligera de miosina, que tienen varios sitios de unión a iones de calcio y se cree que derivan de un origen común en términos de evolución molecular. También hay muchos motivos conocidos de unión al calcio. Dichos motivos bien conocidos incluyen, por ejemplo, dominios de cadherina, mano EF de calmodulina, dominio C2 de proteína quinasa C, dominio Gla de proteína de coagulación sanguínea Factor IX, lectinas de tipo C del receptor de asialoglicoproteína y receptor de unión a manosa, dominios A de receptores de LDL, anexina, dominio de trombospodina tipo 3 y dominios similares a EGF.

En la presente invención, cuando el ion metálico es ion calcio, las condiciones de concentración de iones de calcio incluyen condiciones de concentración baja de iones de calcio y condiciones de concentración alta de iones de calcio. "La actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno contenido en la molécula de unión al antígeno de la presente descripción varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones de calcio" significa que la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno contenido en la molécula de unión al antígeno varía debido a la diferencia en las condiciones entre las concentraciones bajas y altas de iones de calcio. Por ejemplo, la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno puede ser mayor en condiciones de concentración alta de iones de calcio que en condiciones de concentración baja de iones de calcio. Alternativamente, la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno puede ser, por ejemplo, mayor en condiciones de concentración baja de iones de calcio que en condiciones de concentración alta de iones de calcio.

En el presente documento, la concentración alta de iones de calcio no está particularmente limitada a un valor específico; sin embargo, la concentración se puede seleccionar preferiblemente entre 100 μM y 10 mM. En otra realización, la concentración se puede seleccionar entre 200 μM y 5 mM. En una realización alternativa, la concentración se puede seleccionar entre 400 μM y 3 mM. En otra realización más, la concentración se puede seleccionar entre 200 μM y 2 mM. Además, la concentración se puede seleccionar entre 400 μM y 1 mM. En particular, se prefiere una concentración seleccionada entre 500 μM y 2.5 mM, que está cerca de la concentración plasmática (en sangre) de iones de calcio in vivo.

En el presente documento, la concentración baja de iones de calcio no está particularmente limitada a un valor específico; sin embargo, la concentración se puede seleccionar preferiblemente entre 0.1 μM y 30 μM . En otra realización, la concentración se puede seleccionar entre 0.2 μM y 20 μM . En otra realización más, la concentración se puede seleccionar entre 0.5 μM y 10 μM . En una realización alternativa, la concentración se puede seleccionar entre 1 μM y 5 μM . Además, la concentración se puede seleccionar entre 2 μM y 4 μM . En particular, se prefiere una concentración seleccionada entre 1 μM y 5 μM , que está cerca de la concentración de calcio ionizado en endosomas tempranos in vivo.

En la presente descripción, "la actividad de unión al antígeno es menor en condiciones de concentración baja de iones de calcio que en condiciones de concentración alta de iones de calcio" significa que la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno que comprende el dominio de la presente descripción es más débil a una concentración de iones de calcio seleccionada entre 0.1 μM y 30 μM que a una concentración de iones de calcio seleccionada entre 100 μM y 10 mM. Preferiblemente, significa que la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno que comprende el dominio de la presente invención es más débil a una concentración de iones de calcio seleccionada entre 0.5 μM y 10 μM que a una concentración de iones de calcio seleccionada entre 200 μM y 5 mM. Preferiblemente en particular significa que la actividad de unión al antígeno a la concentración de iones de calcio en el endosoma temprano in vivo es más débil que la de la concentración de iones de calcio en el plasma in vivo; y específicamente, significa que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno es más débil a una concentración de iones de calcio seleccionada entre 1 μM y 5 μM que a una concentración de iones de calcio seleccionada entre 500 μM y 2.5 mM.

Se puede determinar si la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o una molécula de unión al antígeno que comprende el dominio depende de las concentraciones de iones metálicos, por ejemplo, usando métodos de medición conocidos tales como los descritos en la sección "Actividad de unión" antes. Por ejemplo, con el fin de confirmar que la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o una molécula de unión al antígeno que comprende el dominio se hace mayor en condiciones de concentración alta de iones de calcio que en condiciones de concentración baja de iones de calcio, se compara la actividad de unión al antígeno del dominio o la molécula en condiciones de concentración baja y alta de iones de calcio.

En la presente descripción, la expresión "la actividad de unión al antígeno es menor en condiciones de concentración baja de iones de calcio que en condiciones de concentración alta de iones de calcio" también se puede expresar como "la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno que comprende el dominio es mayor en condiciones de concentración alta de iones de calcio que en condiciones de concentración

baja de iones de calcio ". En la presente descripción, "la actividad de unión al antígeno es menor en condiciones de concentración baja de iones de calcio que en condiciones de concentración alta de iones de calcio" a veces se escribe como "la actividad de unión al antígeno es más débil en condiciones de concentración baja de iones de calcio que en condiciones de concentración alta de iones de calcio". Además, "la actividad de unión al antígeno en condiciones de concentración baja de iones de calcio se reduce para que sea menor que en condiciones de concentración alta de iones de calcio" puede escribirse como "la actividad de unión al antígeno en condiciones de concentración baja de iones de calcio se hace más débil que en condiciones de concentración alta de iones de calcio".

Cuando se determina la actividad de unión al antígeno, los expertos en la técnica pueden seleccionar de forma adecuada condiciones distintas de la concentración de iones de calcio, y no están particularmente limitadas. Por ejemplo, la actividad se puede determinar a 37°C en tampón HEPES. Por ejemplo, se puede usar Biacore (GE Healthcare) o similar para la determinación. Cuando el antígeno es un antígeno soluble, la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o una molécula de unión al antígeno que comprende el dominio se puede evaluar haciendo fluir el antígeno como un analito sobre un chip sobre el cual está inmovilizado el dominio de unión al antígeno o la molécula de unión al antígeno que comprende el dominio. Cuando el antígeno es un antígeno de membrana, la actividad de unión de un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno que comprende el dominio al antígeno de membrana se puede evaluar haciendo fluir el dominio de unión al antígeno o la molécula de unión al antígeno que comprende el dominio como un analito sobre un chip en el que está inmovilizado el antígeno.

Siempre que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno de la presente descripción sea más débil en condiciones de concentración baja de iones de calcio que en condiciones de concentración alta de iones de calcio, la relación de la actividad de unión al antígeno entre condiciones de concentración alta y baja de iones de calcio no está particularmente limitada. Sin embargo, la relación de la KD (constante de disociación) de la molécula de unión al antígeno para un antígeno en condiciones de concentración baja de iones de calcio con respecto a la KD en condiciones de concentración alta de iones de calcio, es decir, el valor de KD (Ca 3 μ M)/KD (Ca 2 mM), es preferiblemente 2 o más, más preferiblemente 10 o más, y todavía más preferiblemente 40 o más. El límite superior del valor de KD (Ca 3 μ M)/KD (Ca 2 mM) no está particularmente limitado, y puede ser cualquier valor tal como 400, 1000 o 10 000 siempre que la molécula pueda producirse por técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Cuando el antígeno es un antígeno soluble, se puede usar la KD (constante de disociación) para representar la actividad de unión al antígeno. Mientras que, cuando el antígeno es un antígeno de membrana, se puede usar la KD aparente (constante de disociación aparente) para representar la actividad. La KD (constante de disociación) y la KD aparente (constante de disociación aparente) se pueden determinar por métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, usando Biacore (GE healthcare), diagrama de Scatchard o citómetro de flujo.

Alternativamente, por ejemplo, también se puede usar la constante de velocidad de disociación (kd) preferiblemente como un índice para representar la relación de la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno que comprende el dominio de la presente descripción entre las condiciones de concentración baja y alta de calcio. Cuando se usa la constante de velocidad de disociación (kd) en lugar de la constante de disociación (KD) como un índice para representar la relación de actividad de unión, la relación de la constante de velocidad de disociación (kd) entre condiciones de concentración de calcio alta y baja, es decir, el valor de kd (condiciones de concentración baja de calcio)/kd (condiciones de concentración alta de calcio), es preferiblemente 2 o más, más preferiblemente 5 o más, todavía más preferiblemente 10 o más, y todavía más preferiblemente 30 o más. El límite superior del valor de Kd (condiciones de concentración baja de calcio)/kd (condiciones de concentración alta de calcio) no está particularmente limitado, y puede ser cualquier valor tal como 50, 100 o 200, siempre que la molécula se pueda producir por técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

Cuando el antígeno es un antígeno soluble, se puede usar kd (constante de velocidad de disociación) para representar la actividad de unión al antígeno. Mientras que cuando el antígeno es un antígeno de membrana, se puede usar la kd aparente (constante de velocidad de disociación aparente) para representar la actividad de unión al antígeno. La kd (constante de velocidad de disociación) y la kd aparente (constante de velocidad de disociación aparente) se pueden determinar por métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, usando Biacore (GE healthcare) o citómetro de flujo. En la presente descripción, cuando la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o una molécula de unión al antígeno que comprende el dominio se determina a diferentes concentraciones de iones de calcio, es preferible usar las mismas condiciones excepto las concentraciones de calcio.

Los métodos descritos en el documento WO 2012/073992 (por ejemplo, párrafo 0200-0213) y similares, se pueden presentar como ejemplos de un método de cribado para una molécula de unión al antígeno o un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno en condiciones de concentración baja de iones de calcio es menor que en condiciones de concentración alta de iones de calcio, que es una realización proporcionada por la presente invención.

Bibliotecas

En una realización, se puede obtener un dominio de unión al antígeno o una molécula de unión al antígeno de la presente descripción a partir de una biblioteca que está compuesta principalmente por una pluralidad de moléculas de unión al antígeno cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios de unión al antígeno tienen al menos un

resto de aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno dependiendo de las concentraciones de iones. Las concentraciones de iones incluyen preferiblemente, por ejemplo, concentración de iones metálicos y concentración de iones de hidrógeno.

En el presente documento, una "biblioteca" se refiere a una pluralidad de moléculas de unión al antígeno o una pluralidad de polipéptidos de fusión que contienen moléculas de unión al antígeno, o ácidos nucleicos o polinucleótidos que codifican sus secuencias. Las secuencias de una pluralidad de moléculas de unión al antígeno o una pluralidad de polipéptidos de fusión que contienen moléculas de unión al antígeno en una biblioteca no son idénticas, sino que son diferentes entre sí.

En el presente documento, la frase "las secuencias son diferentes entre sí" en la expresión "una pluralidad de moléculas de unión al antígeno cuyas secuencias son diferentes entre sí" significa que las secuencias de las moléculas de unión al antígeno en una biblioteca son diferentes entre sí. Específicamente, en una biblioteca, el número de secuencias diferentes entre sí refleja el número de clones independientes con diferentes secuencias, y también se puede denominar "tamaño de la biblioteca". El tamaño de la biblioteca de una biblioteca de presentación en fagos convencional varía de 10^6 a 10^{12} . El tamaño de la biblioteca se puede aumentar hasta 10^{14} mediante el uso de técnicas conocidas, tales como presentación en ribosomas. Sin embargo, el número real de partículas de fagos usadas en la selección por pasos de una biblioteca de fagos es en general 10-10 000 veces mayor que el tamaño de la biblioteca. Este exceso de multiplicidad también se conoce como "el número de equivalentes de biblioteca", y significa que hay de 10 a 10 000 clones individuales que tienen la misma secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, en la presente descripción, la frase "las secuencias son diferentes entre sí" significa que las secuencias de moléculas de unión al antígeno independientes en una biblioteca, excluyendo los equivalentes de biblioteca, son diferentes entre sí. Más específicamente, lo anterior significa que hay de 10^6 a 10^{14} moléculas de unión al antígeno cuyas secuencias son diferentes entre sí, preferiblemente de 10^7 a 10^{12} moléculas, más preferiblemente de 10^8 a 10^{11} , y en particular preferiblemente de 10^8 a 10^{10} cuyas secuencias son diferentes entre sí.

En la presente descripción, la frase "una pluralidad de" en la expresión "una biblioteca compuesta principalmente por una pluralidad de moléculas de unión al antígeno" se refiere en general, en el caso de, por ejemplo, moléculas de unión al antígeno, polipéptidos de fusión, moléculas polinucleótidos, vectores o virus de la presente descripción, un grupo de dos o más tipos de la sustancia. Por ejemplo, cuando dos o más sustancias son diferentes entre sí en una característica particular, esto significa que hay dos o más tipos de la sustancia. Dichos ejemplos pueden incluir, por ejemplo, aminoácidos mutantes observados en posiciones de aminoácidos específicas en una secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, cuando hay dos o más moléculas de unión al antígeno de la presente descripción cuyas secuencias son sustancialmente iguales o preferiblemente iguales, excepto por restos flexibles o excepto aminoácidos mutantes particulares en posiciones hipervariables expuestas en la superficie, hay una pluralidad de moléculas de unión al antígeno de la presente descripción. En otro ejemplo, cuando hay dos o más moléculas de polinucleótidos cuyas secuencias son sustancialmente iguales o preferiblemente iguales excepto por los nucleótidos que codifican restos flexibles o los nucleótidos que codifican aminoácidos mutantes de posiciones hipervariables expuestas en la superficie, hay una pluralidad de moléculas de polinucleótidos en la presente descripción.

Además, en la presente descripción, la frase "compuesta principalmente por" en la expresión "una biblioteca compuesta principalmente por una pluralidad de moléculas de unión al antígeno" refleja el número de moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de las concentraciones de iones, entre clones independientes con diferentes secuencias en una biblioteca. Específicamente, es preferible que haya al menos 10^4 moléculas de unión al antígeno que tengan dicha actividad de unión en una biblioteca. Más preferiblemente, los dominios de unión al antígeno de la presente descripción se pueden obtener de una biblioteca que contiene al menos 10^5 moléculas de unión al antígeno que tienen dicha actividad de unión. Todavía más preferiblemente, los dominios de unión al antígeno de la presente descripción se pueden obtener de una biblioteca que contiene al menos 10^6 moléculas de unión al antígeno que tienen dicha actividad de unión. En particular preferiblemente, los dominios de unión al antígeno de la presente descripción se pueden obtener de una biblioteca que contiene al menos 10^7 moléculas de unión al antígeno que tienen dicha actividad de unión. Todavía más preferiblemente, los dominios de unión al antígeno de la presente descripción se pueden obtener de una biblioteca que contiene al menos 10^8 moléculas de unión al antígeno que tienen dicha actividad de unión. Alternativamente, esto también se puede expresar preferiblemente como la relación del número de moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de las concentraciones de iones con respecto al número de clones independientes que tienen diferentes secuencias en una biblioteca. Específicamente, los dominios de unión al antígeno de la presente descripción se pueden obtener de una biblioteca en la que las moléculas de unión al antígeno que tienen dicha actividad de unión representan de 0.1% a 80%, preferiblemente de 0.5% a 60%, más preferiblemente de 1% a 40%, todavía más preferiblemente de 2% a 20%, y en particular preferiblemente de 4% a 10% de clones independientes con diferentes secuencias en la biblioteca. En el caso de polipéptidos de fusión, moléculas de polinucleótidos o vectores, pueden ser posibles expresiones similares usando el número de moléculas o la relación respecto al número total de moléculas. En el caso de virus, también pueden ser posibles expresiones similares que usan el número de viriones o la relación respecto al número total de viriones.

Aminoácidos que alteran la actividad de unión al antígeno de los dominios de unión al antígeno dependiendo de las concentraciones de iones de calcio

Los dominios de unión al antígeno o moléculas de unión al antígeno de la presente descripción que se van a cribar por los métodos de cribado descritos antes se pueden preparar de cualquier manera. Por ejemplo, cuando el ion metálico es ion calcio, se pueden usar dominios de unión al antígeno o moléculas de unión al antígeno preexistentes, bibliotecas preexistentes (biblioteca de fagos, etc.), anticuerpos o bibliotecas preparadas a partir de hibridomas obtenidos por inmunización de animales o a partir de B células de animales inmunizados, anticuerpos o bibliotecas obtenidas por introducción de aminoácidos capaces de formar quelato con calcio (por ejemplo, ácido aspártico y ácido glutámico) o mutaciones de aminoácidos no naturales en los anticuerpos o bibliotecas descritos antes (aminoácidos que pueden formar quelato con calcio (tales como ácido aspártico y ácido glutámico), bibliotecas con un mayor contenido de aminoácidos no naturales, bibliotecas preparadas introduciendo aminoácidos que pueden formar quelato con calcio (tales como ácido aspártico y ácido glutámico) o mutaciones de aminoácidos no naturales en posiciones particulares, o similares.

Los ejemplos de los aminoácidos que alteran la actividad de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno dependiendo de las concentraciones de iones como se ha descrito antes pueden ser cualquier tipo de aminoácidos siempre que los aminoácidos formen un motivo de unión al calcio. Los motivos de unión al calcio son bien conocidos por los expertos en la materia y se han descrito en detalle (por ejemplo, Springer et al. (*Cell* (2000) 102, 275-277); Kawasaki y Kretsinger (*Protein Prof.* (1995) 2, 305-490); Moncrief et al. (*J. Mol. Evol.* (1990) 30, 522-562); Chauvaux et al. (*Biochem. J.* (1990) 265, 261-265); Bairoch y Cox (*FEBS Lett.* (1990) 269, 454-456); Davis (*New Biol.* (1990) 2, 410-419); Schaefer et al. (*Genomics* (1995) 25, 638-643); Economou et al. (*EMBO J.* (1990) 9, 349-354); Wurzburg et al. (*Structure*. (2006) 14, 6, 1049-1058)). Específicamente, cualquier motivo conocido de unión al calcio, incluyendo lectinas de tipo C tales como ASGPR, CD23, MBR y DC-SIGN, se pueden incluir en las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción. Los ejemplos preferidos de dichos motivos de unión a calcio preferidos también incluyen, además de los descritos antes, por ejemplo, el motivo de unión a calcio en el dominio de unión al antígeno de SEQ ID NO: 5.

Además, como aminoácidos que alteran la actividad de unión al antígeno de los dominios de unión al antígeno incluidos en las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción que dependen de las condiciones de concentración de iones de calcio, por ejemplo, también se pueden usar preferiblemente aminoácidos que tienen actividad quelante de metales. Los ejemplos de dichos aminoácidos quelantes de metales incluyen, por ejemplo, serina (Ser (S)), treonina (Thr (T)), asparagina (Asn (N)), glutamina (Gln (Q)), ácido aspártico (Asp (D)) y ácido glutámico (Glu (E)).

Las posiciones en los dominios de unión al antígeno en las que están contenidos los aminoácidos descritos antes no están particularmente limitadas a posiciones particulares, y pueden ser cualquier posición dentro de la región variable de la cadena pesada o región variable de la cadena ligera que forme un dominio de unión al antígeno, siempre que alteren la actividad de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno dependiendo de las concentraciones de iones de calcio. En una realización no limitante, los dominios de unión al antígeno de la presente descripción se pueden obtener de una biblioteca compuesta principalmente por moléculas de unión al antígeno cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios de unión al antígeno de la cadena pesada contienen aminoácidos que alteran la actividad de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno dependiendo de las concentraciones de iones de calcio. En otra realización no limitante, los dominios de unión al antígeno de la presente descripción se pueden obtener de una biblioteca compuesta principalmente por moléculas de unión al antígeno cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios CDR3 de la cadena pesada contienen los aminoácidos mencionados antes. En otra realización más, los dominios de unión al antígeno de la presente descripción se pueden obtener de una biblioteca compuesta principalmente por moléculas de unión al antígeno cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios CDR3 de la cadena pesada contienen los aminoácidos mencionados antes en las posiciones 95, 96, 100a y/o 101 como se indica de acuerdo con el sistema de numeración Kabat.

Por otro lado, en una realización no limitante de la presente descripción, los dominios de unión al antígeno de la presente descripción se pueden obtener de una biblioteca compuesta principalmente por moléculas de unión al antígeno cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios de unión al antígeno de la cadena ligera contienen aminoácidos que alteran la actividad de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno dependiendo de las concentraciones de iones de calcio. En otra realización no limitante, los dominios de unión al antígeno de la presente descripción se pueden obtener de una biblioteca compuesta principalmente por moléculas de unión al antígeno cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios CDR1 de la cadena ligera contienen los aminoácidos mencionados antes. En otra realización más, los dominios de unión al antígeno de la presente descripción se pueden obtener de una biblioteca compuesta principalmente por moléculas de unión al antígeno cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios CDR1 de la cadena ligera contienen los aminoácidos mencionados antes en las posiciones 30, 31, y/o 32 como se indica de acuerdo con el sistema de numeración Kabat.

En otra realización no limitante, los dominios de unión al antígeno de la presente descripción se pueden obtener de una biblioteca compuesta principalmente por moléculas de unión al antígeno cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios CDR2 de la cadena ligera contienen los restos de aminoácidos mencionados antes. En otra realización más no limitante, la presente descripción proporciona bibliotecas compuestas principalmente de moléculas de unión al antígeno cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios CDR2 de la cadena ligera contienen los restos de aminoácidos mencionados antes en la posición 50 como se indica según el sistema de numeración Kabat.

En otra realización más de la presente descripción, los dominios de unión al antígeno de la presente descripción se pueden obtener de una biblioteca compuesta principalmente por moléculas de unión al antígeno cuyas secuencias

son diferentes entre sí y cuyos dominios CDR3 de la cadena ligera contienen los restos de aminoácidos mencionados antes. En una realización alternativa, los dominios de unión al antígeno de la presente descripción se pueden obtener de una biblioteca compuesta principalmente por moléculas de unión al antígeno cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyos dominios CDR3 de la cadena ligera contienen los restos de aminoácidos mencionados antes en la posición 92 como se indica según el sistema de numeración Kabat.

Además, en una realización diferente de la presente descripción, los dominios de unión al antígeno de la presente descripción se pueden obtener de una biblioteca compuesta principalmente por moléculas de unión al antígeno cuyas secuencias son diferentes entre sí y en las que dos o tres CDR seleccionadas de las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera descritas antes contienen los restos de aminoácidos mencionados antes. Además, los dominios de unión al antígeno de la presente descripción se pueden obtener de una biblioteca compuesta principalmente por moléculas de unión al antígeno cuyas secuencias son diferentes entre sí y cuyas cadenas ligeras contienen los restos de aminoácidos mencionados antes en una o más de las posiciones 30, 31, 32, 50 y/o 92 como se indica según el sistema de numeración Kabat.

En una realización particularmente preferida, las secuencias armazón de la región variable de la cadena ligera y/o cadena pesada de una molécula de unión al antígeno contienen preferiblemente secuencias armazón de la línea germinal humana. Por lo tanto, en una realización de la presente descripción, cuando las secuencias armazón son secuencias completamente humanas, se espera que cuando dicha molécula de unión al antígeno de la presente descripción se administre a seres humanos (por ejemplo, para tratar enfermedades), induzca poca o ninguna respuesta inmunogénica. En el sentido anterior, la frase "que contiene una secuencia de línea germinal" en la presente descripción significa que una parte de las secuencias armazón en la presente descripción es idéntica a una parte de cualquier secuencia armazón de la línea germinal humana. Por ejemplo, cuando la secuencia FR2 de la cadena pesada de una molécula de unión al antígeno en la presente descripción es una combinación de secuencias FR2 de cadena pesada de diferentes secuencias armazón de línea germinal humana, dicha molécula también es una molécula de unión al antígeno en la presente descripción "que contiene una secuencia de línea germinal".

Los ejemplos preferidos de armazones incluyen, por ejemplo, secuencias de regiones armazón completamente humanas actualmente conocidas, que se incluyen en el sitio web de V-Base (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) u otros. Esas secuencias de región armazón se pueden usar adecuadamente como una secuencia de línea germinal contenida en una molécula de unión al antígeno de la presente descripción. Las secuencias de la línea germinal se pueden clasificar según su similitud (Tomlinson et al. (*J. Mol. Biol.* (1992) 227, 776-798); Williams y Winter (*Eur. J. Immunol.* (1993) 23, 1456-1461); Cox et al. (*Nat. Genetics* (1994) 7, 162-168)). Se pueden seleccionar secuencias de línea germinal adecuadas de V κ , que se agrupa en siete subgrupos; V λ , que se agrupa en diez subgrupos; y V H , que se agrupa en siete subgrupos.

Las secuencias de V H completamente humanas preferiblemente incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, secuencias de V H de:

subgrupo V H 1 (por ejemplo, V H 1-2, V H 1-3, V H 1-8, V H 1-18, V H 1-24, V H 1-45, V H 1-46, V H 1-58 y V H 1-69);

subgrupo V H 2 (por ejemplo, V H 2-5, V H 2-26 y V H 2-70);

subgrupo V H 3 (V H 3-7, V H 3-9, V H 3-11, V H 3-13, V H 3-15, V H 3-16, V H 3-20, V H 3-21, V H 3-23, V H 3-30, V H 3-33, V H 3-35, V H 3-38, V H 3-43, V H 3-48, V H 3-49, V H 3-53, V H 3-64, V H 3-66, V H 3-72, V H 3-73 y V H 3-74);

subgrupo V H 4 (V H 4-4, V H 4-28, V H 4-31, V H 4-34, V H 4-39, V H 4-59 y V H 4-61);

subgrupo V H 5 (V H 5-51);

subgrupo V H 6 (V H 6-1); y

subgrupo V H 7 (V H 7-4 y V H 7-81).

Estas también se describen en documentos conocidos (Matsuda et al. (*J. Exp. Med.* (1998) 188, 1973-1975)) y similares, y por lo tanto los expertos en la técnica pueden diseñar adecuadamente moléculas de unión al antígeno de la presente descripción basándose en la información de esas secuencias. También es preferible usar otros armazones completamente humanos o subregiones armazón.

Las secuencias de V κ completamente humanas preferiblemente incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo:

A20, A30, L1, L4, L5, L8, L9, L11, L12, L14, L15, L18, L19, L22, L23, L24, O2, O4, O8, O12, O14 y O18 agrupadas en el subgrupo V κ 1;

A1, A2, A3, A5, A7, A17, A18, A19, A23, O1 y O11, agrupadas en el subgrupo V κ 2;

A11, A27, L2, L6, L10, L16, L20 y L25, agrupadas en el subgrupo V κ 3;

B3, agrupadas en el subgrupo V κ 4;

B2 (en lo sucesivo denominada Vk5-2), agrupada en el subgrupo Vk5; y

A10, A14 y A26, agrupadas en el subgrupo Vk6

(Kawasaki et al. (*Eur. J. Immunol.* (2001) 31, 1017-1028); Schable y Zachau (*Biol. Chem. Hoppe Seyler* (1993) 374, 1001-1022); Brensing-Kuppers et al. (*Gene* (1997) 191, 173-181)).

5 Las secuencias de VL completamente humanas preferiblemente incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo:

V1-2, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-20 y V1-22, agrupadas en el subgrupo VL1;

V2-1, V2-6, V2-7, V2-8, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17 y V2-19, agrupadas en el subgrupo VL1;

V3-2, V3-3 y V3-4, agrupadas en el subgrupo VL3;

10 V4-1, V4-2, V4-3, V4-4 y V4-6, agrupadas en el subgrupo VL4; y

V5-1, V5-2, V5-4 y V5-6, agrupadas en el subgrupo VL5 (Kawasaki et al. (*Genome Res.* (1997) 7, 250-261)).

Normalmente, estas secuencias almacén son diferentes entre sí en uno o más restos de aminoácidos. Estas secuencias almacén se pueden usar en combinación con "al menos un resto de aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno dependiendo de las condiciones de concentración de iones" en la presente descripción. Otros ejemplos de almacenes completamente humanos usados en combinación con "al menos un resto de aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno dependiendo de las condiciones de concentración de iones" en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (por ejemplo, Kabat et al. (1991) véase antes; Wu et al. (*J. Exp. Med.* (1970) 132, 211-250)).

20 Sin estar limitados por una teoría particular, se cree que una razón para la expectativa de que el uso de secuencias de línea germinal impida respuestas inmunitarias adversas en la mayoría de los individuos es la siguiente. Como resultado del proceso de maduración por afinidad durante las respuestas inmunitarias normales, ocurre con frecuencia la mutación somática en las regiones variables de la inmunoglobulina. Dichas mutaciones se producen en su mayoría alrededor de las CDR cuyas secuencias son hipervariables, pero también afectan a restos de las regiones almacén.

25 Dichas mutaciones del almacén no existen en los genes de la línea germinal, y también es menor probable que sean inmunogénicas en los pacientes. Por otro lado, la población humana normal está expuesta a la mayoría de las secuencias almacén expresadas a partir de los genes de la línea germinal. Como resultado de la inmunotolerancia, se espera que estos almacenes de líneas germinales tengan baja o ninguna inmunogenicidad en pacientes. Para maximizar la posibilidad de inmunotolerancia, los genes que codifican regiones variables se pueden seleccionar de un grupo de genes de línea germinal funcionales que se producen comúnmente.

Se pueden usar adecuadamente métodos conocidos como la mutagénesis dirigida al sitio (Kunkel et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1985) 82, 488-492)) y la PCR de extensión de solapamiento para producir las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción en las que las secuencias de región variable descritas antes, secuencias de región variable de cadena pesada o ligera, secuencias de CDR, o secuencias almacén contienen aminoácidos que alteran la actividad de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno dependiendo de las condiciones de concentración de iones de calcio.

Por ejemplo, se puede construir una biblioteca que contiene una pluralidad de moléculas de unión al antígeno de la presente descripción cuyas secuencias son diferentes entre sí, combinando regiones variables de cadena pesada preparadas como una biblioteca de secuencias de región variable aleatorizada con una región variable de cadena ligera seleccionada como una secuencia almacén que originalmente contenía al menos un resto de aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno dependiendo de las condiciones de concentración de iones de calcio. Como un ejemplo no limitante, cuando la concentración de iones es la concentración de iones de calcio, dichas bibliotecas preferidas incluyen, por ejemplo, aquellas construidas combinando la secuencia de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 5 (Vk5-2) y la región variable de la cadena pesada producida como una biblioteca de secuencias de región variable aleatorizada.

Alternativamente, una secuencia de región variable de cadena ligera seleccionada como una región almacén que contiene originalmente al menos un resto de aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o una molécula de unión al antígeno como se ha mencionado antes, se puede diseñar para contener varios restos de aminoácidos distintos de los restos de aminoácidos anteriores. En la presente descripción, dichos restos se denominan restos flexibles. El número y la posición de los restos flexibles no están particularmente limitados siempre que la actividad de unión al antígeno del dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno de la presente descripción varíe dependiendo de la concentración de iones. Específicamente, las secuencias de CDR y/o las secuencias de FR de la cadena pesada y/o la cadena ligera pueden contener uno o más restos flexibles. Por ejemplo, cuando la concentración de iones es la concentración de iones de calcio, los ejemplos no limitantes de restos flexibles que se van a introducir en la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 5 (Vk5-2)

ES 2 795 419 T3

incluyen los restos de aminoácidos dados en las Tablas 1 o 2.

Tabla 1

CDR	Numeración Kabat	Aminoácido en 70% del total				
CDR1	28	S : 100%				
	29	I ; 100%				
	30	E : 72%	N : 14%	S : 14%		
	31	D : 100%				
	32	D : 100%				
	33	L : 100%				
	34	A : 70%	N : 30%			
CDR2	50	E : 100%				
	51	A : 100%				
	52	S : 100%				
	53	H : 5%	N : 25%	S : 45%	T : 25%	
	54	L : 100%				
	55	Q : 100%				
	56	S : 100%				
CDR3	90	Q: 100%				
	91	H : 25%	S : 15%	R : 15%	Y : 45%	
	92	D : 80%	N : 10%	S : 10%		
	93	D : 5%	G : 10%	N : 25%	S : 50%	R : 10%
	94	S : 50%	Y : 50%			
	95	P : 100%				
	96	L : 50 %	Y : 50%			

(La posición indica numeración Kabat)

Tabla 2

CDR	Numeración Kabat	Aminoácido en 30% del total				
CDR1	28	S : 100%				
	29	I : 100%				
	30	E : 83%	S : 17%			
	31	D : 100%				
	32	D : 100%				
	33	L ; 100%				
	34	A : 70%	N : 30%			
CDR2	50	H : 100%				
	51	A : 100%				
	52	S : 100%				
	53	H : 5%	N : 25%	S : 45%	T : 25%	
	54	L : 100%				
	55	Q : 100%				
	56	S : 100%				
CDR3	90	Q: 100%				
	91	H : 25%	S : 15%	R : 15%	Y : 45%	
	92	D : 80%	N : 10%	S : 10%		
	93	D : 5%	G : 10%	N : 25%	S : 50%	R : 10%

CDR	Numeración Kabat	Aminoácido en 30% del total				
	94	S : 50%	Y : 50 %			
	95	P : 100%				
	96	L : 50%	Y : 50%			

(La posición indica numeración Kabat)

En la presente memoria, los restos flexibles se refieren a variaciones de restos de aminoácidos presentes en posiciones hipervariables en las que están presentes varios aminoácidos diferentes en las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada cuando se comparan las secuencias de aminoácidos de anticuerpos conocidos y/o naturales o dominios de unión al antígeno. Las posiciones hipervariables generalmente se encuentran en las regiones CDR. En una realización, los datos proporcionados por Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health Bethesda Md.) son útiles para determinar posiciones hipervariables en anticuerpos conocidos y/o naturales. Además, las bases de datos en Internet (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>, <http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html>) proporcionan las secuencias recogidas de muchas cadenas ligeras y cadenas pesadas humanas y sus ubicaciones. La información sobre las secuencias y ubicaciones es útil para determinar posiciones hipervariables en la presente descripción. De acuerdo con la presente descripción, cuando una determinada posición de aminoácidos tiene preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 posibles variaciones de restos de aminoácidos, preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 19, preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 18, preferiblemente de 5 a 17, preferiblemente de 6 a 16, preferiblemente 7 a 15, preferiblemente 8 a 14, preferiblemente 9 a 13, y preferiblemente 10 a 12 posibles variaciones de restos de aminoácidos, la posición es hipervariable. En algunas realizaciones, una determinada posición de aminoácido puede tener preferiblemente al menos aproximadamente 2, preferiblemente al menos aproximadamente 4, preferiblemente al menos aproximadamente 6, preferiblemente al menos aproximadamente 8, preferiblemente aproximadamente 10, y preferiblemente aproximadamente 12 variaciones de restos de aminoácidos.

Alternativamente, se puede construir una biblioteca que contenga una pluralidad de moléculas de unión al antígeno de la presente descripción cuyas secuencias son diferentes entre sí, combinando regiones variables de cadena pesada producidas como una biblioteca de secuencias de región variable aleatorizada con regiones variables de cadena ligera en las que se introduce al menos un resto de aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno dependiendo de la concentración de iones como se ha mencionado antes. Cuando la concentración de iones es la concentración de iones de calcio, los ejemplos no limitantes de dichas bibliotecas incluyen preferiblemente, por ejemplo, bibliotecas en las que las regiones variables de cadena pesada producidas como una biblioteca de secuencias de región variable aleatorias se combinan con secuencias de región variable de cadena ligera en las que un resto o restos particulares en una secuencia de línea germinal tal como SEQ ID NO: 6 (Vk1), SEQ ID NO: 7 (Vk2), SEQ ID NO: 8 (Vk3) o SEQ ID NO: 9 (Vk4) se ha sustituido por al menos un resto de aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno dependiendo de las concentraciones de iones de calcio. Ejemplos no limitantes de dichos restos de aminoácidos incluyen restos de aminoácidos en la CDR1 de cadena ligera. Además, los ejemplos no limitantes de dichos restos de aminoácidos incluyen restos de aminoácidos en la CDR2 de cadena ligera. Además, los ejemplos no limitantes de dichos restos de aminoácidos también incluyen restos de aminoácidos en la CDR3 de cadena ligera.

Los ejemplos no limitantes de dichos restos de aminoácidos contenidos en la CDR1 de cadena ligera incluyen aquellos en las posiciones 30, 31 y/o 32 en la CDR1 de la región variable de la cadena ligera como se indica por la numeración EU. Además, los ejemplos no limitantes de dichos restos de aminoácidos contenidos en la CDR2 de la cadena ligera incluyen un resto de aminoácido en la posición 50 en la CDR2 de la región variable de la cadena ligera como se indica por la numeración Kabat. Además, los ejemplos no limitantes de dichos restos de aminoácidos contenidos en CDR3 de cadena ligera incluyen un resto de aminoácido en la posición 92 en el CDR3 de la región variable de cadena ligera como se indica por la numeración Kabat. Estos restos de aminoácidos pueden estar contenidos solos o en combinación siempre que formen un motivo de unión al calcio y/o siempre que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno varíe dependiendo de las concentraciones de iones de calcio. Por otro lado, puesto que se conoce la cadena ligera de la troponina C, calmodulina, parvalbúmina y miosina, que tienen varios sitios de unión a iones de calcio y se cree que derivan de un origen común en términos de evolución molecular, la CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera se puede diseñar para que tenga sus motivos de unión. Por ejemplo, se pueden usar dominios de cadherina, mano EF de calmodulina, dominio C2 de proteína quinasa C, dominio Gla de proteína de coagulación sanguínea Factor IX, lectinas tipo C del receptor de asialoglicoproteína y receptor de unión a manosa, dominios A de receptores de LDL, anexina, dominio de trombospondina tipo 3 y dominios similares a EGF de una manera adecuada para los fines anteriores.

Cuando las regiones variables de la cadena pesada producidas como una biblioteca de secuencias de región variable aleatorias y las regiones variables de la cadena ligera en las que se ha introducido al menos un resto de aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno dependiendo de las condiciones de concentración de iones, se combinan como se ha descrito antes, las secuencias de las regiones variables de la cadena ligera se pueden diseñar para contener restos flexibles de la misma manera que se ha descrito antes. El número y la posición de dichos restos flexibles no están particularmente limitados a realizaciones particulares siempre que la actividad de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción varíe dependiendo de

las condiciones de concentración de iones. Específicamente, las secuencias de CDR y/o las secuencias de FR de la cadena pesada y/o la cadena ligera pueden contener uno o más restos flexibles. Cuando la concentración de iones es la concentración de iones de calcio, los ejemplos no limitantes de restos flexibles que se van a introducir en la secuencia de la región variable de la cadena ligera incluyen los restos de aminoácidos dados en las Tablas 1 y 2.

Las regiones variables de la cadena pesada preferidas que se van a combinar incluyen, por ejemplo, bibliotecas de regiones variables aleatorizadas. Se combinan métodos conocidos según sea adecuado para producir una biblioteca de región variable aleatorizada. En una realización no limitante de la presente descripción, se puede usar una biblioteca inmunitaria construida basada en genes de anticuerpos derivados de linfocitos de animales inmunizados con un antígeno específico, pacientes con infecciones, personas con un título de anticuerpos elevado en sangre como resultado de la vacunación, pacientes con cáncer, o pacientes con enfermedades autoinmunitarias, preferiblemente como una biblioteca de regiones variables aleatorizada.

En otra realización no limitante de la presente descripción, también se puede usar preferiblemente una biblioteca sintética producida reemplazando las secuencias de CDR de genes V en ADN genómico o genes V reformados funcionales con un conjunto de oligonucleótidos sintéticos que contienen secuencias que codifican conjuntos de codones de una longitud adecuada, como una biblioteca de regiones variables aleatorizada. En este caso, puesto que se observa diversidad de secuencias en la secuencia de CDR3 de la cadena pesada, también se puede reemplazar solo la secuencia de CDR3. Un criterio para dar diversidad en los aminoácidos en la región variable de una molécula de unión al antígeno es que la diversidad se da a restos de aminoácidos en posiciones expuestas en la superficie en la molécula de unión al antígeno. La posición expuesta en la superficie se refiere a una posición que se considera que puede ser expuesta en la superficie y/o ponerse en contacto con un antígeno, basado en la estructura, el conjunto de estructuras y/o la estructura modelada de una molécula de unión al antígeno. En general, dichas posiciones son CDR. Preferiblemente, las posiciones expuestas en la superficie se determinan usando coordenadas de un modelo tridimensional de una molécula de unión al antígeno usando un programa informático tal como el programa InsightII (Accelrys). Las posiciones expuestas en la superficie se pueden determinar usando algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, Lee y Richards (*J. Mol. Biol.* (1971) 55, 379-400); Connolly (*J. Appl. Cryst.* (1983) 16, 548-558)). La determinación de las posiciones expuestas en la superficie se puede llevar a cabo usando un software adecuado para el modelado de proteínas y la información estructural tridimensional obtenida de un anticuerpo. El software que se puede usar para estos fines incluye preferiblemente el software SYBYL Biopolymer Module (Tripos Associates). En general o preferiblemente, cuando un algoritmo requiere que el usuario introduzca un parámetro de tamaño, el "tamaño" de una sonda que se usa en el cálculo se establece en aproximadamente 1.4 Angstrom o menos en radio. Además, Pacios (*Comput. Chem* (1994) 18 (4), 377-386; *J. Mol. Model.* (1995) 1, 46-53) describe métodos para determinar las regiones y áreas expuestas en la superficie usando software para ordenadores personales).

En otra realización no limitante de la presente descripción, también se puede usar en particular preferiblemente una biblioteca *naïve*, que se construye a partir de genes de anticuerpos derivados de linfocitos de personas sanas y cuyo repertorio consiste en secuencias *naïve*, que son secuencias de anticuerpos sin sesgo, como una biblioteca de regiones variables aleatorizada (Gejima et al. (*Human Antibodies* (2002) 11, 121-129); Cardoso et al. (*Scand J. Immunol.* (2000) 51, 337-344)). En el presente documento, una secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia *naïve* se refiere a una secuencia de aminoácidos obtenida de dicha biblioteca *naïve*.

En una realización de la presente descripción, se puede obtener un dominio de unión al antígeno de la presente descripción a partir de una biblioteca que contiene una pluralidad de moléculas de unión al antígeno de la presente descripción cuyas secuencias son diferentes entre sí, preparadas combinando regiones variables de cadena ligera construidas como una biblioteca de secuencias de región variable aleatorizada con una región variable de cadena pesada seleccionada como una secuencia armazón que originalmente contiene "al menos un resto de aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno dependiendo de las condiciones de concentración de iones". Cuando la concentración de iones es la concentración de iones de calcio, los ejemplos no limitantes de dichas bibliotecas incluyen preferiblemente las construidas combinando regiones variables de cadena ligera construidas como una biblioteca de secuencias de región variable aleatorizada con la secuencia de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 10 (6RL#9-IgG1) o SEQ ID NO: 11 (6KC4-1#85-IgG1). Alternativamente, dicha biblioteca se puede construir seleccionando regiones variables de cadena ligera adecuadas de aquellas que tienen secuencias de línea germinal, en lugar de regiones variables de cadena ligera construidas como una biblioteca de secuencias de región variable aleatorizada.

Dichas bibliotecas preferidas incluyen, por ejemplo, aquellas en las que la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 10 (6RL#9-IgG1) o SEQ ID NO: 11 (6KC4-1#85-IgG1) se combina con regiones variables de cadena ligera que tienen secuencias de línea germinal.

Alternativamente, la secuencia de una región variable de la cadena pesada seleccionada como una secuencia armazón que originalmente contiene "al menos un resto de aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno dependiendo de las condiciones de concentración de iones" como se ha mencionado antes, se puede diseñar para contener restos flexibles. El número y la posición de los restos flexibles no están particularmente limitados siempre que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno de la presente descripción varíe dependiendo de las condiciones de concentración de iones. Específicamente, las secuencias de CDR y/o FR de la cadena pesada y/o la cadena ligera pueden contener uno o más restos flexibles.

Quando la concentración de iones es la concentración de iones de calcio, los ejemplos no limitantes de restos flexibles que se van a introducir en la secuencia de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 10 (6RL#9-IgG1) incluyen todos los restos de aminoácidos de la CDR1 y CDR2 de la cadena pesada y los restos de aminoácidos de la CDR3 de la cadena pesada excepto los de posiciones 95, 96 y/o 100a. Alternativamente, los ejemplos no limitantes de restos flexibles que se van a introducir en la secuencia de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 11 (6KC4-1#85-IgG1) incluyen todos los restos de aminoácidos de la CDR1 y CDR2 de la cadena pesada y los restos de aminoácidos de la CDR3 de la cadena pesada excepto los de las posiciones de aminoácidos 95 y/o 101.

Alternativamente, se puede construir una biblioteca que contenga una pluralidad de moléculas de unión al antígeno cuyas secuencias son diferentes entre sí combinando regiones variables de cadena ligera construidas como una biblioteca de secuencias de región variable aleatorizada o regiones variables de cadena ligera que tienen secuencias de línea germinal con regiones variables de cadena pesada en las que se ha introducido "al menos un resto de aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno dependiendo de las condiciones de concentración de iones" como se ha mencionado antes. Cuando la concentración de iones es la concentración de iones de calcio, los ejemplos no limitantes de dichas bibliotecas incluyen preferiblemente aquellos en los que las regiones variables de la cadena ligera construidas como una biblioteca de secuencias de región variable aleatorizada o regiones variables de la cadena ligera que tienen secuencias de línea germinal se combinan con la secuencia de una región variable de la cadena pesada de cadena en la que un resto(s) particular(es) se ha(n) sustituido con al menos un resto de aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno dependiendo de las condiciones de concentración de iones de calcio. Ejemplos no limitantes de dichos restos de aminoácidos incluyen restos de aminoácidos de la CDR1 de la cadena pesada. Otros ejemplos no limitantes de dichos restos de aminoácidos incluyen restos de aminoácidos de la CDR2 de la cadena pesada. Además, los ejemplos no limitantes de dichos restos de aminoácidos también incluyen restos de aminoácidos de la CDR3 de la cadena pesada. Los ejemplos no limitantes de dichos restos de aminoácidos de la CDR3 de la cadena pesada incluyen el(los) aminoácido(s) en las posiciones 95, 96, 100a y/o 101 en la CDR3 de la región variable de la cadena pesada como se indica por la numeración Kabat. Además, estos restos de aminoácidos pueden estar contenidos solos o en combinación siempre que formen un motivo de unión a calcio y/o la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno varíe dependiendo de las condiciones de concentración de iones de calcio.

Quando las regiones variables de la cadena ligera construidas como una biblioteca de secuencias de región variable aleatorizada o regiones variables de la cadena ligera que tienen una secuencia de línea germinal se combinan con una región variable de la cadena pesada en la que se ha introducido al menos un resto de aminoácido que altera la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno que depende de las condiciones de concentración de iones mencionadas antes, la secuencia de la región variable de la cadena pesada también se puede diseñar para contener restos flexibles de la misma manera que se ha descrito antes. El número y posición de los restos flexibles no están particularmente limitados siempre que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno de la presente descripción varíe dependiendo de las condiciones de concentración de iones. Específicamente, las secuencias de CDR y/o FR de la cadena pesada pueden contener uno o más restos flexibles. Además, se pueden usar preferiblemente bibliotecas de regiones variables aleatorizadas como secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la región variable de la cadena pesada distintas de los restos de aminoácidos que alteran la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno dependiendo de condiciones de concentración de iones. Cuando se usan secuencias de línea germinal como regiones variables de la cadena ligera, los ejemplos no limitantes de dichas secuencias incluyen las de SEQ ID NO: 6 (Vk1), SEQ ID NO: 7 (Vk2), SEQ ID NO: 8 (Vk3) y SEQ ID NO: 9 (Vk4).

Se puede usar preferiblemente cualquiera de los aminoácidos descritos antes que alteran la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno dependiendo de las condiciones de concentración de iones de calcio, siempre que formen un motivo de unión a calcio. Específicamente, dichos aminoácidos incluyen aminoácidos donadores de electrones. Los ejemplos preferidos de dichos aminoácidos donadores de electrones incluyen serina, treonina, asparagina, ácido glutámico, ácido aspártico y ácido glutámico.

Condiciones de concentraciones de iones de hidrógeno

En una realización de la presente descripción, las condiciones de concentraciones de iones se refieren a las condiciones de concentraciones de iones de hidrógeno o condiciones de pH. En la presente descripción, la concentración de protones, es decir, el núcleo del átomo de hidrógeno, se trata como sinónimo de índice de hidrógeno (pH). Cuando la actividad del ion hidrógeno en una solución acuosa se representa como aH^+ , el pH se define como $-\log_{10}aH^+$. Cuando la fuerza iónica de la solución acuosa es baja (por ejemplo, menor de 10^{-3}), aH^+ es casi igual a la fuerza de iones de hidrógeno. Por ejemplo, el producto iónico del agua a 25°C y 1 atmósfera es $K_w = aH^+ + aOH = 10^{-14}$ y, por lo tanto, en agua pura, $aH^+ = aOH = 10^{-7}$. En este caso, pH = 7 es neutro; una solución acuosa cuyo pH es inferior a 7 es ácida o cuyo pH es superior a 7 es alcalina.

En la presente descripción, cuando las condiciones de pH se usan como las condiciones de concentración de iones, las condiciones de pH incluyen condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajos, es decir, unas condiciones de intervalo de pH ácido y condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH altos, es decir, unas condiciones de intervalo de pH neutro. "La actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno contenido en la molécula de unión al antígeno de la presente descripción varía dependiendo de las condiciones de

pH" significa que la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno contenido en una molécula de unión al antígeno varía debido a la diferencia en las condiciones de una concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo (un intervalo de pH ácido) y una concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto (un intervalo de pH neutro). Esto incluye, por ejemplo, el caso donde la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno es mayor en unas condiciones de intervalo de pH neutro que en unas condiciones de intervalo de pH ácido y el caso donde la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno es mayor en condiciones de intervalo de pH ácido que en condiciones de intervalo de pH neutro.

En el presente documento, el intervalo de pH neutro no se limita a un valor específico y se selecciona preferiblemente entre pH 6.7 y pH 10.0. En otra realización, el pH se puede seleccionar entre pH 6.7 y pH 9.5. En otra realización más, el pH se puede seleccionar entre pH 7.0 y pH 9.0. En otra realización más, el pH se puede seleccionar entre pH 7.0 y pH 8.0. En particular, el pH preferido incluye pH 7.4, que está cerca del pH del plasma (sangre) in vivo.

En el presente documento, un intervalo de pH ácido no se limita a un valor específico y se selecciona preferiblemente entre pH 4.0 y pH 6.5. En otra realización, el pH se puede seleccionar entre pH 4.5 y pH 6.5. En otra realización más, el pH se puede seleccionar entre pH 5.0 y pH 6.5. En otra realización más, el pH se puede seleccionar entre pH 5.5 y pH 6.5. En particular, el pH preferido incluye pH 5.8, que está cerca de la concentración de calcio ionizado en el endosoma temprano in vivo.

En la presente descripción, "la actividad de unión al antígeno en unas condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo (un intervalo de pH ácido) es menor que en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto (un intervalo de pH neutro)" significa que la actividad de unión al antígeno del dominio de unión al antígeno o la molécula de unión al antígeno que comprende el dominio de la presente descripción a un pH seleccionado entre pH 4.0 y pH 6.5 es más débil que aquella a un pH seleccionado entre pH 6.7 y pH 10.0; preferiblemente significa que la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno que comprende el dominio a un pH seleccionado entre pH 4.5 y pH 6.5 es más débil que aquella a un pH seleccionado entre pH 6.7 y pH 9.5; más preferiblemente, significa que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a un pH seleccionado entre pH 5.0 y pH 6.5 es más débil que a un pH seleccionado entre pH 7.0 y pH 9.0; aún más preferiblemente significa que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a un pH seleccionado entre pH 5.5 y pH 6.5 es más débil que aquella a un pH seleccionado entre pH 7.0 y pH 8.0; en particular preferiblemente significa que la actividad de unión al antígeno al pH en el endosoma temprano in vivo es más débil que la actividad de unión al antígeno al pH del plasma in vivo; y específicamente significa que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a pH 5.8 es más débil que la actividad de unión al antígeno a pH 7.4.

Se puede determinar si la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o una molécula de unión al antígeno que comprende el dominio ha cambiado por las condiciones de pH, por ejemplo, mediante el uso de métodos de medición conocidos tales como los descritos en la sección "Actividad de unión" más arriba. Por ejemplo, la actividad de unión se mide bajo diferentes condiciones de pH usando los métodos de medición descritos antes. Por ejemplo, la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o una molécula de unión al antígeno que comprende el dominio se compara en condiciones de intervalo de pH ácido e intervalo de pH neutro para confirmar que la actividad de unión del dominio o la molécula cambia para ser mayor en las condiciones de intervalo de pH neutro que en las condiciones de intervalo de pH ácido.

Además, en la presente descripción, la expresión "la actividad de unión al antígeno en condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en condiciones de intervalo de pH ácido, es menor que en condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH neutro" también se puede expresar como "la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno que comprende el dominio en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en condiciones de intervalo de pH neutro, es mayor que en condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en condiciones de intervalo de pH ácido". En la presente descripción, "la actividad de unión al antígeno en unas condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH ácido, es más débil que la capacidad de unión al antígeno en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en condiciones de intervalo de pH neutro". Alternativamente, "la actividad de unión al antígeno en unas condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH ácido, se reduce para que sea menor que en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH neutro" se puede describir como "la actividad de unión al antígeno en unas condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH ácido, se reduce para ser más débil que la capacidad de unión al antígeno en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH neutro".

Los expertos en la técnica pueden seleccionar de forma adecuada las condiciones distintas de la concentración de iones de hidrógeno o pH para medir la actividad de unión al antígeno, y no están particularmente limitadas. Las

mediciones se pueden llevar a cabo, por ejemplo, a 37°C usando tampón HEPES. Las mediciones se pueden llevar a cabo, por ejemplo, usando Biacore (GE Healthcare). Cuando el antígeno es un antígeno soluble, la actividad de unión al antígeno del dominio de unión al antígeno o la molécula de unión al antígeno que comprende el dominio se puede determinar evaluando la actividad de unión al antígeno soluble haciendo fluir el antígeno como un analito en un chip inmovilizado con el dominio de unión al antígeno o la molécula de unión al antígeno que comprende el dominio. Cuando el antígeno es un antígeno de membrana, la actividad de unión al antígeno de membrana se puede evaluar haciendo fluir el dominio de unión al antígeno o la molécula de unión al antígeno que comprende el dominio como analito en un chip inmovilizado con el antígeno.

Siempre que la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno de la presente descripción en unas condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH ácido sea más débil que en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH neutro, la relación de la actividad de unión al antígeno entre en unas condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH ácido, y en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH neutro, no está particularmente limitada, y el valor de $KD(pH\ 5.8)/KD(pH\ 7.4)$, que es la relación de la constante de disociación (KD) para un antígeno en unas condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH ácido a la KD en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH neutro, es preferiblemente 2 o más; más preferiblemente, el valor de $KD(pH\ 5.8)/KD(pH\ 7.4)$ es 10 o más; y todavía más preferiblemente el valor de $KD(pH\ 5.8)/KD(pH\ 7.4)$ es 40 o más. El límite superior del valor de $KD(pH\ 5.8)/KD(pH\ 7.4)$ no está particularmente limitado, y puede ser cualquier valor tal como 400, 1000 o 10 000, siempre que la molécula se pueda producir por las técnicas de los expertos en la técnica.

Alternativamente, por ejemplo, se puede usar adecuadamente la constante de velocidad de disociación (k_d) como un índice para indicar la relación de la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno que comprende el dominio de la presente descripción entre en unas condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH ácido y en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH neutro. Cuando se usa la k_d (constante de velocidad de disociación) como índice para indicar la relación de la actividad de unión en lugar de la KD (constante de disociación), el valor de k_d (en unas condiciones de intervalo de pH ácido)/ k_d (en unas condiciones de intervalo de pH neutro), que es la relación de k_d (constante de velocidad de disociación) para el antígeno en unas condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH ácido a k_d (constante de velocidad de disociación) en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH neutro, es preferiblemente 2 o más, más preferiblemente 5 o más, todavía más preferiblemente 10 o más, y todavía más preferiblemente 30 o más. El límite superior del valor de k_d (en unas condiciones de intervalo de pH ácido)/ k_d (en unas condiciones de intervalo de pH neutro) no está particularmente limitado, y puede ser cualquier valor tal como 50, 100 o 200, siempre que la molécula se pueda producir por las técnicas de los expertos en la técnica.

Cuando el antígeno es un antígeno soluble, se puede usar la constante de velocidad de disociación (k_d) como el valor para la actividad de unión al antígeno y cuando el antígeno es un antígeno de membrana, se puede usar la constante de velocidad de disociación aparente (k_d). La constante de velocidad de disociación (k_d) y la constante de velocidad de disociación aparente (k_d) se pueden determinar por métodos conocidos por los expertos en la técnica, y se pueden usar Biacore (GE healthcare), citómetro de flujo, y similares. En la presente descripción, cuando la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno que comprende el dominio se mide a diferentes concentraciones de iones de hidrógeno, es decir, pH, las condiciones distintas a la concentración de iones de hidrógeno, es decir, pH, preferiblemente son las mismas.

Por ejemplo, un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno en unas condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH ácido es menor que en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH neutro, que es una realización proporcionada por la presente descripción, se puede obtener por cribado de dominios de unión al antígeno o moléculas de unión al antígeno, que comprende las siguientes etapas (a) a (c):

(a) obtener la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno en unas condiciones de intervalo de pH ácido;

(b) obtener la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno en unas condiciones de intervalo de pH neutro; y

(c) seleccionar un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno en las condiciones de intervalo de pH ácido es menor que en las condiciones de intervalo de pH neutro.

Alternativamente, un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno en unas condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en unas condiciones de intervalo

de pH ácido, es menor que en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH neutro, que es una realización proporcionada por la presente descripción, se puede obtener por cribado de dominios de unión al antígeno o moléculas de unión al antígeno, o una biblioteca de los mismos, que comprende las siguientes etapas (a) para (c):

- 5 (a) poner en contacto un dominio de unión al antígeno o una molécula de unión al antígeno, o una biblioteca de los mismos, en unas condiciones de intervalo de pH neutro con un antígeno;
- (b) poner en unas condiciones de intervalo de pH ácido el dominio de unión al antígeno o la molécula de unión al antígeno unida al antígeno en la etapa (a); y
- (c) aislar el dominio de unión al antígeno o la molécula de unión al antígeno disociada en la etapa (b).
- 10 Un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno en unas condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH ácido es menor que en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH neutro, que es otra realización proporcionada por la presente descripción, se puede obtener por cribado de dominios de unión al antígeno o moléculas de unión al antígeno, o una biblioteca de los mismos,
- 15 que comprende las siguientes etapas (a) a (d):
- (a) poner en contacto en unas condiciones de intervalo de pH ácido un antígeno con una biblioteca de dominios de unión al antígeno o moléculas de unión al antígeno;
- (b) seleccionar el dominio de unión al antígeno o la molécula de unión al antígeno que no se une al antígeno en la etapa (a);
- 20 (c) permitir que el dominio de unión al antígeno o la molécula de unión al antígeno seleccionada en la etapa (b) se unan con el antígeno en unas condiciones de intervalo de pH neutro; y
- (d) aislar el dominio de unión al antígeno o la molécula de unión al antígeno unida al antígeno en la etapa (c).
- Un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno en unas condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH ácido, es menor que en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH neutro, que es incluso otra realización proporcionada por la presente descripción, se puede obtener por un método de cribado que comprende las siguientes etapas (a) a (c):
- 25 (a) poner en contacto en unas condiciones de intervalo de pH neutro una biblioteca de dominios de unión al antígeno o moléculas de unión al antígeno con una columna inmovilizada con un antígeno;
- 30 (b) eluir de la columna en unas condiciones de intervalo de pH ácido el dominio de unión al antígeno o la molécula de unión al antígeno unida a la columna en la etapa (a); y
- (c) aislar el dominio de unión al antígeno o la molécula de unión al antígeno eluida en la etapa (b).
- Un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno en unas condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH ácido, es menor que en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH neutro, que es otra realización más proporcionada por la presente descripción, se puede obtener por un método de cribado que comprende las siguientes etapas (a) a (d):
- 35 (a) permitir, en unas condiciones de intervalo de pH ácido, que una biblioteca de dominios de unión al antígeno o moléculas de unión al antígeno pase una columna inmovilizada con un antígeno;
- 40 (b) recoger el dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno eluido sin unirse a la columna en la etapa (a);
- (c) permitir que el dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno recogida en la etapa (b) se una con el antígeno en unas condiciones de intervalo de pH neutro; y
- (d) aislar el dominio de unión al antígeno o la molécula de unión al antígeno unida al antígeno en la etapa (c).
- Un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a una concentración de iones de hidrógeno alta o pH bajo, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH ácido, es menor que a una concentración de iones de hidrógeno baja o pH alto, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH neutro, que es otra realización más proporcionada por la presente descripción, se puede obtener por un método de cribado que comprende las siguientes etapas (a) a (d):
- 45 (a) poner en contacto un antígeno con una biblioteca de dominios de unión al antígeno o moléculas de unión al antígeno en unas condiciones de intervalo de pH neutro;
- 50

(b) obtener el dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno unida al antígeno en la etapa (a);

(c) poner en unas condiciones de intervalo de pH ácido el dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno obtenida en la etapa (b); y

5 (d) aislar el dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno en la etapa (c) es más débil que la referencia seleccionada en la etapa (b).

Las etapas descritas antes se pueden repetir dos o más veces. Por lo tanto, la presente descripción proporciona dominios de unión al antígeno y moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno en unas condiciones de intervalo de pH ácido es menor que en unas condiciones de intervalo de pH neutro, que se obtienen mediante un método de cribado que comprende además las etapas de repetir las etapas (a) a (c) o (a) a (d) en los métodos de cribado descritos antes. El número de veces que se repiten las etapas (a) a (c) o (a) a (d) no está particularmente limitado; sin embargo, en general el número es 10 o menos.

En los métodos de cribado de la presente descripción, la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno en unas condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en un intervalo de pH ácido, no está particularmente limitada, siempre que sea la actividad de unión al antígeno a un pH de entre 4.0 y 6.5, e incluye la actividad de unión al antígeno a un pH de entre 4.5 y 6.6 como el pH preferido. La actividad de unión al antígeno también incluye aquella a un pH de entre 5.0 y 6.5, y aquella a un pH de entre 5.5 y 6.5 como otro pH preferido. La actividad de unión al antígeno también incluye aquella al pH en el endosoma temprano in vivo como el pH más preferido, y específicamente, aquella a pH 5.8. Por otro lado, la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en un intervalo de pH neutro, no está particularmente limitada, siempre que sea la actividad de unión al antígeno a un pH de entre 6.7 y 10, e incluye la actividad de unión al antígeno a un pH de entre 6.7 y 9.5 como el pH preferido. La actividad de unión al antígeno también incluye aquella a un pH de entre 7.0 y 9.5 y aquella a un pH de entre 7.0 y 8.0 como otro pH preferido. La actividad de unión al antígeno también incluye aquella al pH de plasma in vivo como el pH más preferido, y específicamente, aquella a pH 7.4.

La actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o una molécula de unión al antígeno se puede medir por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica pueden determinar adecuadamente otras condiciones además de la concentración de calcio ionizado. La actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno se puede evaluar basándose en la constante de disociación (KD), constante de disociación aparente (KD), constante de velocidad de disociación (kd), constante de velocidad de disociación aparente (kd), y similares. Estas se pueden determinar por métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, usando Biacore (GE healthcare), gráfica de Scatchard o FACS.

En la presente descripción, la etapa de seleccionar un dominio de unión al antígeno o una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH neutro, es mayor que unas condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH ácido, es sinónimo de la etapa de seleccionar un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno en unas condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH ácido, es menor que en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH neutro.

Siempre que la actividad de unión al antígeno en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH neutro, sea mayor que en unas condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH ácido, la diferencia entre la actividad de unión al antígeno en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH neutro, y aquella en unas condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH ácido, no está particularmente limitada; sin embargo, la actividad de unión al antígeno en unas condiciones de concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH neutro, es preferiblemente dos veces o más, más preferiblemente 10 veces o más, y todavía más preferiblemente 40 veces o más que aquella en unas condiciones de concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH ácido.

50 Aminoácidos que alteran la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno que depende de las condiciones de concentración de iones de hidrógeno

El dominio de unión al antígeno o la molécula de unión al antígeno de la presente descripción que se va a cribar por los métodos de cribado descritos antes se pueden preparar de cualquier manera. Por ejemplo, se pueden usar moléculas de unión al antígeno convencionales, bibliotecas convencionales (biblioteca de fagos, etc.), anticuerpos o bibliotecas preparadas a partir de linfocitos B de animales inmunizados o de hibridomas obtenidos inmunizando animales, anticuerpos o bibliotecas (bibliotecas con mayor contenido de aminoácidos con un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales, bibliotecas con aminoácidos introducidos con un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o mutaciones de

aminoácidos no naturales en posiciones específicas, etc.) obtenidas por introducción de aminoácidos con un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o mutaciones de aminoácidos no naturales en los anticuerpos o bibliotecas descritos antes.

Los métodos para obtener un dominio de unión al antígeno o una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a una concentración baja de iones de hidrógeno o pH alto, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH neutro, es mayor que aquella a una concentración alta de iones de hidrógeno o pH bajo, es decir, en unas condiciones de intervalo de pH ácido, a partir de dominios de unión al antígeno o moléculas de unión al antígeno preparadas a partir de hibridomas obtenidos por inmunización de animales o de linfocitos B de animales inmunizados, incluyen preferiblemente, por ejemplo, la molécula de unión al antígeno o la molécula de unión al antígeno en la que al menos uno de los aminoácidos del dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno se sustituye por un aminoácido con un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o una mutación de aminoácido no natural, o se inserta en el dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno un aminoácido con un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o un aminoácido no natural, tales como los descritos en el documento WO 2009/125825.

Los sitios de introducción de mutaciones de aminoácidos con un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales no están particularmente limitados, y pueden estar en cualquier posición siempre que la actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH ácido se vuelva más débil que en un intervalo de pH neutro (el valor de KD (en un intervalo de pH ácido)/KD (en un intervalo de pH neutro) o kd (en un intervalo de pH ácido)/kd (en un intervalo de pH neutro) aumenta) en comparación con antes de la sustitución o inserción. Por ejemplo, cuando la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo, la región variable del anticuerpo y las CDR son adecuadas. Los expertos en la técnica pueden determinar adecuadamente el número de aminoácidos con los que se va a hacer la sustitución o el número de aminoácidos con un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales que se van a insertar. Se puede hacer la sustitución con un solo aminoácido que tenga un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o un solo aminoácido no natural; se puede insertar un solo aminoácido que tenga un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o un solo aminoácido no natural; se puede hacer la sustitución con dos o más aminoácidos que tienen un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o dos o más aminoácidos no naturales; y se pueden insertar dos o más aminoácidos que tienen un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o dos o más aminoácidos no naturales. Alternativamente, se pueden eliminar, añadir, insertar y/o sustituir simultáneamente otros aminoácidos, aparte de la sustitución en aminoácidos que tienen un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales, o la inserción de aminoácidos que tienen un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales. La sustitución o inserción de aminoácidos con un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales se puede llevar a cabo aleatoriamente mediante métodos tales como el barrido de histidina, en el que la alanina del barrido de alanina conocido por los expertos en la técnica se reemplaza con histidina. Las moléculas de unión al antígeno que presentan un mayor valor de KD (en un intervalo de pH ácido)/KD (en un intervalo de pH neutro) o kd (en un intervalo de pH ácido)/kd (en un intervalo de pH neutro) en comparación con antes de la mutación se pueden seleccionar de dominios de unión al antígeno o anticuerpos con inserciones aleatorias o mutaciones de sustituciones de aminoácidos con un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) introducidas o aminoácidos no naturales.

Los ejemplos preferidos de moléculas de unión al antígeno que contienen la mutación a aminoácidos con un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales como se ha descrito antes y cuya actividad de unión al antígeno en un intervalo de pH ácido es más bajo que en un intervalo de pH neutro, incluyen moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno en el intervalo de pH neutro después de la mutación a aminoácidos con un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales es comparable a aquella anterior a la mutación a aminoácidos con un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales. En la presente memoria, "una molécula de unión al antígeno después de la mutación con aminoácidos que tienen un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales, tiene una actividad de unión al antígeno comparable a aquella antes de la mutación con aminoácidos que tienen un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales" significa que, cuando se considera la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno antes de la mutación con aminoácidos que tienen un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales como 100%, la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno después de la mutación con aminoácidos que tienen un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (para ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales es al menos 10% o más, preferiblemente 50% o más, más preferiblemente 80% o más, y todavía más preferiblemente 90% o más. La actividad de unión al antígeno después de la mutación de aminoácidos con un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales a pH 7.4 puede ser mayor que antes de la mutación de aminoácidos con un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales a pH 7.4. Si la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno disminuye debido a la inserción de o la sustitución por aminoácidos con un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales, la actividad de unión al antígeno se puede hacer que sea comparable a aquella antes de la inserción de o la sustitución por aminoácidos con un pKa de la cadena lateral de 4.0-

8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales, mediante la introducción de una sustitución, eliminación, adición y/o inserción de uno o más aminoácidos de la molécula de unión al antígeno. La presente descripción también incluye moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión se ha ajustado para que sea comparable mediante sustitución, eliminación, adición y/o inserción de uno o más aminoácidos después de la sustitución o inserción de aminoácidos con un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0 (por ejemplo, histidina y ácido glutámico) o aminoácidos no naturales.

En una realización de la presente descripción, también se puede construir una biblioteca que contiene múltiples dominios de unión al antígeno o moléculas de unión al antígeno de la presente descripción cuyas secuencias son diferentes entre sí, combinando regiones variables de cadena pesada, producidas como una biblioteca de secuencias de región variable aleatorizada, con regiones variables de cadena ligera introducidas con "al menos un resto de aminoácido que cambia la actividad de unión al antígeno del dominio de unión al antígeno o la molécula de unión al antígeno dependiendo de las condiciones de concentración de iones de hidrógeno".

Dichos restos de aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, restos de aminoácidos contenidos en la CDR1 de la cadena ligera. Los restos de aminoácidos también incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, restos de aminoácidos contenidos en la CDR2 de la cadena ligera. Los restos de aminoácidos también incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, restos de aminoácidos contenidos en la CDR3 de la cadena ligera.

Los restos de aminoácidos descritos antes contenidos en la CDR1 de la cadena ligera incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, resto(s) de aminoácido(s) de las posiciones 24, 27, 28, 31, 32 y/o 34 según a la numeración Kabat en la CDR1 de la región variable de la cadena ligera. Mientras que los restos de aminoácidos contenidos en la CDR2 de la cadena ligera incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, resto(s) de aminoácido(s) de las posiciones 50, 51, 52, 53, 54, 55 y/o 56 según la numeración Kabat en la CDR2 de la región variable de la cadena ligera. Además, los restos de aminoácidos en la CDR3 de la cadena ligera incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, restos de aminoácidos de la o las posiciones 89, 90, 91, 92, 93, 94 y/o 95A según la numeración Kabat en la CDR3 de la región variable de la cadena ligera. Además, los restos de aminoácidos pueden estar contenidos solos o en combinación de dos o más aminoácidos, siempre que permitan el cambio en la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno dependiendo de las condiciones de concentración de iones de hidrógeno.

Incluso cuando la región variable de la cadena pesada producida como una biblioteca de secuencias de región variable aleatorizada se combina con la región variable de la cadena ligera descrita antes en la que se ha introducido "al menos un resto de aminoácido que cambia la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno dependiendo de las condiciones de concentración de iones de hidrógeno", se puede diseñar de manera que los restos flexibles estén contenidos en la secuencia de la región variable de la cadena ligera de la misma manera que se ha descrito antes. El número y la posición de los restos flexibles no están particularmente limitados a una realización específica, siempre que la actividad de unión al antígeno del dominio de unión al antígeno o la molécula de unión al antígeno de la presente descripción cambie dependiendo de las condiciones de concentración de iones de hidrógeno. Específicamente, las secuencias de CDR y/o FR de la cadena pesada y/o la cadena ligera pueden contener uno o más restos flexibles. Por ejemplo, los restos flexibles que se van a introducir en las secuencias de las regiones variables de la cadena ligera incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, los restos de aminoácidos dados en las Tablas 3 y 4. Por otro lado, las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena ligera distintas de los restos flexibles y los restos de aminoácidos que cambian la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno dependiendo de las condiciones de concentración de iones de hidrógeno incluyen adecuadamente, pero no se limitan a secuencias de línea germinal tales como Vk1 (SEQ ID NO: 6), Vk2 (SEQ ID NO: 7), Vk3 (SEQ ID NO: 8) y Vk4 (SEQ ID NO: 9).

Tabla 3

Posición	Aminoácido									
CDR1										
28	S:100%									
29	I:100%									
30	N:25%	S:25%	R:25%	H:25%						
31	S:100%									
32	H:100%									
33	L:100%									
34	A:50%	N:50%								
CDR2										
50	H:100%				O	A:25%	D:25%	G:25%	K:25%	
51	A: 100%					A: 100%				
52	S:100%					S:100%				
53	K:33.3%	N:33.3 %	S:33.3 %			H:100%				
54	L:100%					L:100%				
55	Q:100%					Q:100%				
56	S:100%					S:100%				
CDR3										
90	Q:100%				O	Q:100%				
91	H:100%					S:33.3%	R:33.3 %	Y:33.3 %		
92	G:25%	N:25%	S:25%	Y:25%		H:100%				
93	H:33.3 %	N:33.3 %	S:33.3 %			H:33.3%	N:33.3 %	S:33.3 %		
94	S:50%	Y:50%				S:50%	Y:50%			
95	P:100%					P:100%				
96	L:50%	Y:50%				L:50%	Y:50%			

(La posición indica numeración Kabat)

Tabla 4

CDR	Posición	Aminoácido				
CDR1	28	S:100%				
	29	I:100%				
	30	H:30%	N: 10%	S:50%	R:10%	
	31	N:35%	S:65%			
	32	H:40%	N:20%	Y:40%		
	33	L: 100%				
	34	A : 70%	N:30%			
CDR2	50	A:25%	D:15%	G:25%	H:30%	K:5%
	51	A:100%				
	52	S:100%				
	53	H:30%	K:10%	N:15%	S : 45%	
	54	L: 100%				
	55	Q:100%				
	56	S:100%				

CDR	Posición	Aminoácido				
CDR3	90	Q:100%				
	91	H:30%	S:15%	R:10%	Y:45%	
	92	G:20%	H:30%	N:20%	S:15%	Y:15%
	93	H:30%	N:25%	S:45%		
	94	S:50%	Y:50%			
	95	P: 100%				
	96	L:50%	Y:50%			

(La posición indica numeración Kabat)

Se puede usar cualquier resto de aminoácido adecuadamente como los restos de aminoácido descritos antes que cambian la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno o molécula de unión al antígeno dependiendo de las condiciones de concentración de iones de hidrógeno. Específicamente, dichos restos de aminoácidos incluyen aminoácidos con un pKa de la cadena lateral de 4.0-8.0. Dichos aminoácidos liberadores de electrones incluyen preferiblemente, por ejemplo, aminoácidos que se encuentran de forma natural tales como histidina y ácido glutámico, así como aminoácidos no naturales tales como análogos de histidina (documento US2009/0035836), m-NO₂-Tyr (pKa 7.45), 3,5-Br₂-Tyr (pKa 7.21) y 3,5-12-Tyr (pKa 7.38) (*Bioorg. Med. Chem.* (2003) 11 (17), 3761-3768). Los restos de aminoácidos particularmente preferidos incluyen, por ejemplo, aminoácidos con un pKa de la cadena lateral de 6.0-7.0. Dichos restos de aminoácidos liberadores de electrones incluyen preferiblemente, por ejemplo, histidina.

La región variable de cadena pesada preferida que se usa en combinación incluye, por ejemplo, bibliotecas de regiones variables aleatorizadas. Se combinan adecuadamente métodos conocidos como un método para producir una biblioteca de regiones variables aleatorizada. En una realización no limitante de la presente descripción, una biblioteca inmunitaria construida basada en genes de anticuerpos derivados de animales inmunizados con antígenos específicos, pacientes con infección o personas con un título elevado de anticuerpos en sangre como resultado de vacunación, pacientes con cáncer o linfocitos de enfermedades autoinmunitarias se puede usar adecuadamente como una biblioteca de regiones variables aleatorizada.

En otra realización no limitante de la presente descripción, de la misma manera que se ha descrito antes, una biblioteca sintética en la que las secuencias de CDR de genes V de ADN genómico o genes V reconstruidos funcionales se reemplazan por un conjunto de oligonucleótidos sintéticos que contienen las secuencias que codifican conjuntos de codones de una longitud adecuada, también se puede usar adecuadamente como una biblioteca de regiones variables aleatorizada. En este caso, se puede reemplazar la secuencia de CDR3 sola porque se observa variedad en la secuencia génica de la CDR3 de cadena pesada. La base para dar lugar a variaciones de aminoácidos en la región variable de una molécula de unión al antígeno es generar variaciones de restos de aminoácidos de posiciones expuestas en la superficie de la molécula de unión al antígeno. La posición expuesta en la superficie se refiere a una posición donde un aminoácido está expuesto en la superficie y/o se pone en contacto con un antígeno basado en la conformación, conjunto estructural y/o estructura modelada de una molécula de unión al antígeno, y en general, dichas posiciones son las CDR. Las posiciones expuestas en la superficie se determinan preferiblemente usando las coordenadas derivadas de un modelo tridimensional de la molécula de unión al antígeno usando programas de informáticos tales como el programa InsightII (Accelrys). Las posiciones expuestas en la superficie se pueden determinar usando algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, Lee y Richards (*J. Mol. Biol.* (1971) 55, 379-400); Connolly (*J. Appl. Cryst* (1983) 16, 548-558)). Las posiciones expuestas en la superficie se pueden determinar basándose en la información sobre la estructura tridimensional de los anticuerpos usando un software adecuado para la modelización de proteínas. El software que se usa adecuadamente para este propósito incluye el software del módulo de biopolímeros SYBYL (Tripos Associates). Cuando el algoritmo requiere que el usuario introduzca el parámetro de tamaño, el "tamaño" de la sonda para su uso en computación se establece generalmente o preferiblemente en un radio de aproximadamente 1.4 angstrom o menos. Además, Pacios (*Comput. Chem* (1994) 18 (4), 377-386; y *J. Mol. Model.* (1995) 1, 46-53) describe un método para determinar la región y el área expuestas en la superficie usando software de ordenador personal).

En otra realización no limitante de la presente descripción, también se puede usar en particular adecuadamente una biblioteca *naïve* construida a partir de genes de anticuerpos derivados de linfocitos de personas sanas y que consiste en secuencias *naïve*, que son un repertorio sin sesgo de secuencias de anticuerpos, como una biblioteca de regiones variables aleatorizada (Gejima et al. (*Human Antibodies* (2002) 11, 121-129); y Cardoso et al. (*Scand J. Immunol.* (2000) 51, 337-344)).

FcRn

A diferencia del receptor Fcγ que pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas, el FcRn humano es estructuralmente similar a los polipéptidos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I, presentando una identidad de secuencia de 22% a 29% con las moléculas de MHC de clase I (Ghetie et al., *Immunol. Today* (1997)

18 (12): 592-598). FcRn se expresa como un heterodímero que consiste en cadena ligera o β soluble (microglobulina $\beta 2$) complejada con cadena pesada o α transmembrana. Al igual que el MHC, la cadena α de FcRn comprende tres dominios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) y su dominio citoplasmático corto ancla la proteína en la superficie celular. Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ interaccionan con el dominio de unión a FcRn de la región Fc del anticuerpo (Raghavan et al., *Immunity* (1994) 1: 303-315).

El FcRn es expresado en la placenta materna y el saco vitelino de mamíferos, y está implicado en la transferencia de IgG de madre a feto. Además, en el intestino delgado neonatal de roedores, donde se expresa FcRn, el FcRn está implicado en la transferencia de IgG materna a través del epitelio de borde en cepillo desde el calostro o la leche ingeridos. El FcRn es expresado en una variedad de otros tejidos y sistemas de células endoteliales de varias especies. El FcRn también es expresado en endotelios humanos adultos, vasos sanguíneos musculares y capilares sinusoidales hepáticos. Se cree que el FcRn tiene una función en el mantenimiento de la concentración de IgG en el plasma al mediar la recirculación de la IgG al suero tras la unión a la IgG. Típicamente, la unión de FcRn a moléculas de IgG depende estrictamente del pH. La unión óptima se observa en un intervalo de pH ácido por debajo de 7.0.

El FcRn humano cuyo precursor es un polipéptido que tiene la secuencia señal de SEQ ID NO: 12 (el polipéptido con la secuencia señal se muestra en la SEQ ID NO: 13) forma un complejo con la microglobulina $\beta 2$ humana in vivo. El FcRn humano soluble complejado con microglobulina $\beta 2$ se produce usando técnicas convencionales de expresión recombinante. Se puede evaluar en dominio de unión a FcRn de la presente descripción su actividad de unión a un FcRn humano soluble complejado con microglobulina $\beta 2$. En la presente memoria, a menos que se especifique lo contrario, el FcRn humano se refiere a una forma capaz de unirse a un dominio de unión a FcRn de la presente descripción. Los ejemplos incluyen un complejo entre FcRn humano y la microglobulina $\beta 2$ humana.

Actividad de unión a FcRn, FcRn humano en particular, de un dominio de unión a FcRn o molécula de unión al antígeno que comprende el dominio

La actividad de unión a FcRn, FcRn humano en particular, de un dominio de unión a FcRn contenido en una molécula de unión al antígeno proporcionada por la presente descripción, se puede medir por métodos conocidos por los expertos en la técnica, como se describe en la sección "Actividad de unión" más arriba. Los expertos en la técnica pueden determinar adecuadamente las condiciones distintas al pH. La actividad de unión al FcRn humano del dominio de unión al antígeno o la molécula de unión al antígeno que comprende el dominio, se puede evaluar basándose en la constante de disociación (KD), constante de disociación aparente (KD), velocidad de disociación (kd), velocidad de disociación aparente (kd), y similares. Estos se pueden medir por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar Biacore (GE Healthcare), gráfica de Scatchard o citómetro de flujo.

Cuando se mide la actividad de unión al FcRn humano de un dominio de unión al FcRn o una molécula de unión al antígeno que comprende el dominio de la presente descripción, las condiciones distintas del pH no están particularmente limitadas, y los expertos en la técnica pueden seleccionarlas adecuadamente. Las mediciones se pueden llevar a cabo, por ejemplo, en unas condiciones de 37°C usando tampón MES, como se describe en el documento WO 2009/125825. Alternativamente, la actividad de unión al FcRn humano de un dominio de unión al FcRn o una molécula de unión al antígeno que comprende el dominio de la presente descripción se puede medir por métodos conocidos por los expertos en la técnica, y se puede medir usando, por ejemplo, Biacore (GE Healthcare) o similares. La actividad de unión al FcRn humano de un dominio de unión al FcRn o molécula de unión al antígeno que comprende el dominio de la presente descripción se puede evaluar haciendo fluir, como un analito, el FcRn humano o un dominio de unión a FcRn o molécula de unión al antígeno que comprende el dominio en un chip inmovilizado con un dominio de unión a FcRn o molécula de unión al antígeno que comprende el dominio, o FcRn humano.

En la presente descripción, el intervalo de pH ácido presentado como las condiciones para tener actividad de unión entre FcRn y una molécula de unión al antígeno de la presente descripción o dominio de unión al FcRn en la molécula generalmente se refiere de pH 4.0 a pH 6.5. Preferiblemente se refiere a de pH 5.5 a pH 6.5, y en particular preferiblemente se refiere de pH 5.8 a pH 6.0 que está cerca del pH en un endosoma temprano in vivo. El intervalo de pH neutro presentado como las condiciones para tener actividad de unión entre FcRn y una molécula de unión al antígeno de la presente descripción o un dominio de unión a FcRn incluido en dicha molécula generalmente se refiere a pH 6.7 a pH 10.0. El intervalo de pH neutro es preferiblemente un intervalo indicado por cualquier valor de pH de pH 7.0 a pH 8.0, y se selecciona preferiblemente de pH 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9 y 8.0, y es en particular preferiblemente pH 7.4 que está cerca del pH en el plasma (en sangre) in vivo. Cuando es difícil evaluar la afinidad de unión entre el FcRn humano y un dominio de unión al FcRn humano o una molécula de unión al antígeno que contiene ese dominio a pH 7.4 debido a la baja afinidad de unión, se puede usar pH 7.0 en lugar de pH 7.4. Como temperatura para usar en condiciones de ensayo, la afinidad de unión entre un FcRn humano y un dominio de unión a FcRn humano o una molécula de unión al antígeno que comprende el dominio se puede evaluar a cualquier temperatura de 10°C a 50°C. Preferiblemente, se usa una temperatura de 15°C a 40°C para determinar la afinidad de unión entre un FcRn humano y un dominio de unión a FcRn humano o una molécula de unión al antígeno que comprende el dominio. Más preferiblemente, cualquier temperatura de 20°C a 35°C, tal como cualquiera de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 y 35°C también se usa igualmente para determinar la afinidad de unión entre un dominio de unión a FcRn humano o una molécula de unión al antígeno que comprende el dominio y FcRn humano. Una temperatura de 25°C es un ejemplo no limitante de una realización de la presente descripción.

Dominio de unión al FcRn

Las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción tienen un dominio de unión al FcRn que tiene una actividad para unirse al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido. El dominio de unión al FcRn no está particularmente limitado siempre que las moléculas de unión al antígeno tengan una actividad de unión al FcRn en un intervalo de pH ácido, y puede ser un dominio que tenga actividad de unión directa o indirecta al FcRn. Los ejemplos preferidos de dicho dominio de unión al FcRn incluyen la región Fc de inmunoglobulina IgG, albúmina, dominio de albúmina 3, anticuerpo anti-FcRn descrito en Christianson et al. (*mAbs* (2012) 4 (2), 208-216), péptido anti-FcRn descrito en el documento WO 2007/098420, molécula anti-armazón de FcRn, y las que tienen una actividad para unirse directamente al FcRn, o moléculas que se unen a IgG o albúmina, y las que tienen una actividad para unirse indirectamente al FcRn. Si el dominio ya tiene actividad de unión al FcRn en un intervalo de pH ácido, se puede usar preferiblemente como está. Si el dominio no tiene o tiene una actividad débil de unión al FcRn en un intervalo de pH ácido, los aminoácidos que constituyen un dominio de unión al FcRn en la molécula de unión al antígeno se pueden alterar para conferir actividad de unión al FcRn. Alternativamente, se pueden alterar aminoácidos en un dominio que ya tiene actividad de unión al FcRn en un intervalo de pH ácido para aumentar la actividad de unión al FcRn en un intervalo de pH ácido. Para la alteración de aminoácidos del dominio de unión al FcRn, la alteración de interés se puede identificar comparando las actividades de unión al FcRn en un intervalo de pH ácido antes y después de la alteración de aminoácidos.

Región Fc

Una región Fc contiene la secuencia de aminoácidos derivada de la región constante de la cadena pesada de un anticuerpo. Una región Fc es una porción de la región constante de la cadena pesada de un anticuerpo, que empieza a partir del extremo N terminal de la región bisagra, que corresponde al sitio de escisión de papaína en un aminoácido alrededor de la posición 216 de acuerdo con el sistema de numeración EU, y contiene los dominios bisagra, CH2 y CH3. Si bien la región Fc se puede obtener a partir de IgG1 humana, no se limita a una subclase particular de IgG. Los ejemplos de dicha realización no limitante de la región Fc incluyen las regiones Fc de IgG1 humana (SEQ ID NO: 14), IgG2 (SEQ ID NO: 15), IgG3 (SEQ ID NO: 16) o IgG4 (SEQ ID NO: 17).

Dominio de unión al FcRn que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido

Como se ha descrito antes, en una realización no limitante de la presente descripción, se usa una región Fc de una inmunoglobulina de IgG humana como el dominio de unión al FcRn que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido. Una región Fc que originalmente tenía actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido se puede usar como está para este dominio, y los ejemplos de dichas regiones Fc incluyen regiones Fc de IgG humanas (IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, y sus variantes). Cuando una región Fc tiene una actividad de unión al FcRn débil o no tiene en unas condiciones de intervalo de pH ácido, las regiones Fc que tienen actividad de unión al FcRn deseada se pueden obtener alterando los aminoácidos de la región Fc. Alternativamente, las regiones Fc que tienen actividad de unión al FcRn deseada o potenciada en unas condiciones de intervalo de pH ácido se pueden obtener adecuadamente alterando los aminoácidos en la región Fc. Las alteraciones de aminoácidos de una región Fc que da como resultado dicha actividad de unión deseada se pueden determinar comparando la actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido antes y después de la alteración de aminoácidos. Por ejemplo, dichas alteraciones de aminoácidos se pueden determinar por métodos descritos en la sección mencionada antes "Actividad de unión al FcRn, FcRn humano en particular, de un dominio de unión al FcRn o molécula de unión al antígeno que comprende el dominio".

Las alteraciones de la región Fc que potencian la actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido se presentan a continuación como ejemplos de una realización no limitante de dichas alteraciones. Las regiones Fc preferidas (regiones Fc iniciales) de una inmunoglobulina de tipo IgG para alteración incluyen, por ejemplo, las de las IgG humanas (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y sus variantes). El origen de las regiones Fc iniciales no está limitado, y se pueden obtener de organismos humanos o cualquiera no humano. Dichos organismos preferiblemente incluyen ratones, ratas, cobayas, hamsters, jerbos, gatos, conejos, perros, cabras, ovejas, bovinos, caballos, camellos y organismos seleccionados de primates no humanos. En otra realización, las regiones Fc iniciales también se pueden obtener de macacos cangrejeros, tíes, monos rhesus, chimpancés o humanos. Las regiones Fc iniciales se pueden obtener preferiblemente de IgG1 humana; sin embargo, no están limitadas a ninguna subclase de IgG en particular. Esto significa que una región Fc representada por la IgG1 humana (SEQ ID NO: 14), IgG2 (SEQ ID NO: 15), IgG3 (SEQ ID NO: 16) o IgG4 (SEQ ID NO: 17) se puede usar adecuadamente como una región Fc inicial, y en la presente memoria también significa que una región Fc de una clase o subclase arbitraria de IgG derivada de cualquier organismo descrito antes se puede usar preferiblemente como una región Fc inicial. Ejemplos de variantes de IgG de origen natural o formas modificadas se describen en documentos publicados (*Curr. Opin. Biotechnol.* (2009) 20 (6): 685-91; *Curr. Opin. Immunol.* (2008) 20 (4), 460-470; *Protein Eng. Des. Sel.* (2010) 23 (4): 195-202; WO 2009/086320; WO 2008/092117; WO 2007/041635; y WO 2006/105338); sin embargo, no se limitan a los ejemplos.

Los ejemplos de alteraciones incluyen aquellos con una o más mutaciones, por ejemplo, mutaciones por sustitución de diferentes restos de aminoácidos para los aminoácidos de las regiones Fc iniciales, por inserción de uno o más restos de aminoácidos en las regiones Fc iniciales, o por eliminación de uno o más más aminoácidos de la región Fc inicial. Preferiblemente, las secuencias de aminoácidos de las regiones Fc alteradas comprenden al menos una parte

de la secuencia de aminoácidos de una región Fc no natural. Dichas variantes tienen necesariamente una identidad o similitud de secuencia inferior a 100% con respecto a su región Fc inicial. En una realización preferida, las variantes tienen identidad o similitud de secuencia de aminoácidos de aproximadamente 75% a menos de 100%, más preferiblemente de aproximadamente 80% a menos de 100%, incluso más preferiblemente de aproximadamente 85% a menos de 100%, todavía más preferiblemente de aproximadamente 90% a menos de 100%, y lo más preferiblemente de aproximadamente 95% a menos de 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos de su región Fc inicial. En una realización no limitante de la presente descripción, al menos un aminoácido es diferente entre una región Fc modificada de la presente descripción y su región Fc inicial. La diferencia de aminoácidos entre una región Fc modificada de la presente descripción y su región Fc inicial también se puede especificar preferiblemente basándose en las diferencias de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos particulares descritas antes de acuerdo con la numeración EU.

Siempre que la región Fc tenga una actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido o pueda aumentar la actividad de unión al FcRn humano en unas condiciones de intervalo de pH ácido, los aminoácidos en cualquier posición se pueden modificar a otros aminoácidos. Cuando la molécula de unión al antígeno de la presente descripción contiene la región Fc de IgG1 humana como el dominio de unión al FcRn, es preferible que la región Fc resultante contenga una modificación que dé como resultado el efecto de mejorar la unión de FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc de IgG1 humana inicial. Los aminoácidos que permiten dicha modificación incluyen, por ejemplo, el o los aminoácidos en las posiciones 252, 254, 256, 309, 311, 315, 433 y/o 434 según la numeración EU, y su combinación de aminoácidos en la o las posiciones 253, 310, 435 y/o 426 como se describe en el documento WO 1997/034631. Los ejemplos favorables incluyen aminoácido(s) en las posiciones 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439 y/o 447 según lo indicado por la numeración EU como se describe en el documento WO 2000/042072. De manera similar, los ejemplos favorables de aminoácidos que permiten dicha modificación incluyen aminoácido(s) en las posiciones 251, 252, 254, 255, 256, 308, 309, 311, 312, 385, 386, 387, 389, 428, 433, 434 y/o 436 según la numeración EU como se describe en el documento WO 2002/060919. Además, los aminoácidos que permiten dicha modificación incluyen, por ejemplo, el o los aminoácidos en las posiciones 250, 314 y 428 según la numeración EU como se describe en el documento WO2004/092219. Además, ejemplos favorables de aminoácidos que permiten dicha modificación incluyen aminoácidos en las posiciones 238, 244, 245, 249, 252, 256, 257, 258, 260, 262, 270, 272, 279, 283, 285, 286, 288, 293, 307, 311, 312, 316, 317, 318, 332, 339, 341, 343, 375, 376, 377, 378, 380, 382, 423, 427, 430, 431, 434, 436, 438, 440 y/o 442 como se describe en el documento WO 2006/020114. Además, ejemplos favorables de aminoácidos que permiten dicha modificación incluyen el o los aminoácidos en las posiciones 251, 252, 307, 308, 378, 428, 430, 434 y/o 436 según la numeración EU como se describe en el documento WO 2010/045193. La modificación de estos aminoácidos potencia la unión al FcRn de la región Fc de una inmunoglobulina de tipo IgG en unas condiciones de intervalo de pH ácido.

Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como el dominio de unión al FcRn, una realización no limitante de la modificación que da como resultado el efecto de mejorar la unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc inicial de IgG1 humana incluye al menos una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

- Arg o Leu para el aminoácido en la posición 251;
- Phe, Ser, Thr o Tyr para el aminoácido en la posición 252;
- Ser o Thr para el aminoácido en la posición 254;
- Arg, Gly, Ile o Leu para el aminoácido en la posición 255;
- Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu o Thr para el aminoácido en la posición 256;
- Ile o Thr para el aminoácido en la posición 308;
- Pro para el aminoácido en la posición 309;
- Glu, Leu o Ser para el aminoácido en la posición 311;
- Ala o Asp para el aminoácido en la posición 312; Ala o Leu para el aminoácido en la posición 314;
- Ala, Arg, Asp, Gly, His, Lys, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 385;
- Arg, Asp, Ile, Lys, Met, Pro, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 386;
- Ala, Arg, His, Pro, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 387;
- Asn, Pro o Ser para el aminoácido en la posición 389;
- Leu, Met, Phe, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 428;

Arg, Gln, His, Ile, Lys, Pro o Ser para el aminoácido en la posición 433;

His, Phe o Tyr para el aminoácido en la posición 434; y

Arg, Asn, His, Lys, Met o Thr para el aminoácido en la posición 436, como indica la numeración EU. Por otro lado, el número de aminoácidos que se van a modificar no está particularmente limitado; y el aminoácido se puede modificar en un solo sitio o se pueden modificar aminoácidos en dos o más sitios.

Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como el dominio de unión al FcRn, una realización no limitante de la modificación que da como resultado el efecto de mejorar la unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc inicial de la IgG1 humana pueden ser modificaciones que incluyen Ile para el aminoácido en la posición 308, Pro para el aminoácido en la posición 309 y/o Glu para el aminoácido en la posición 311 de acuerdo con la numeración EU. Otra realización no limitante de esta modificación puede incluir Thr para el aminoácido en la posición 308, Pro para el aminoácido en la posición 309, Leu para el aminoácido en la posición 311, Ala para el aminoácido en la posición 312 y/o Ala para el aminoácido en la posición 314. Además, otra realización no limitante de esta modificación puede incluir Ile o Thr para el aminoácido en la posición 308, Pro para el aminoácido en la posición 309, Glu, Leu o Ser para el aminoácido en la posición 311, Ala para el aminoácido en la posición 312, y/o Ala o Leu para el aminoácido en la posición 314. Otra realización no limitante de esta modificación puede incluir Thr para el aminoácido en la posición 308, Pro para el aminoácido en la posición 309, Ser para el aminoácido en la posición 311, Asp para el aminoácido en la posición 312 y/o Leu para el aminoácido en la posición 314.

Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como el dominio de unión a FcRn, una realización no limitante de la modificación que da como resultado el efecto de potenciar la unión a FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc inicial de la IgG1 humana pueden ser modificaciones que incluyen Leu para el aminoácido en la posición 251, Tyr para el aminoácido en la posición 252, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 254, Arg para el aminoácido en la posición 255, y/o Glu para el aminoácido en la posición 256 según la numeración EU.

Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como el dominio de unión a FcRn, una realización no limitante de la modificación que da como resultado el efecto de potenciar la unión a FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc inicial de la IgG1 humana pueden ser modificaciones que incluyen Leu, Met, Phe, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 428, Arg, Gln, His, Ile, Lys, Pro o Ser para el aminoácido en la posición 433, His, Phe o Tyr para el aminoácido en la posición 434, y/o Arg, Asn, His, Lys, Met o Thr para el aminoácido en la posición 436 según la numeración EU. Otra realización no limitante de esta modificación puede incluir His o Met para el aminoácido en la posición 428, y/o His o Met para el aminoácido en la posición 434.

Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como el dominio de unión a FcRn, una realización no limitante de la modificación que da como resultado el efecto de potenciar la unión a FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc inicial de la IgG1 humana pueden ser modificaciones que incluyen Arg para el aminoácido en la posición 385, Thr para el aminoácido en la posición 386, Arg para el aminoácido en la posición 387, y/o Pro para el aminoácido en la posición 389 según la numeración EU. Otra realización no limitante de esta modificación puede incluir Asp para el aminoácido en la posición 385, Pro para el aminoácido en la posición 386 y/o Ser para el aminoácido en la posición 389.

Además, cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como el dominio de unión a FcRn, una realización no limitante de la modificación que da como resultado el efecto de potenciar la unión a FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc inicial de la IgG1 humana incluye al menos una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

Gln o Glu para el aminoácido en la posición 250; y

Leu o Phe para el aminoácido en la posición 428 según la numeración EU. El número de aminoácidos que se van a modificar no está particularmente limitado; y el aminoácido se puede modificar en solo un sitio o los aminoácidos se pueden modificar en dos sitios.

Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como el dominio de unión a FcRn, una realización no limitante de la modificación que da como resultado el efecto de potenciar la unión a FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc inicial de la IgG1 humana pueden ser modificaciones que incluyen Gln para el aminoácido en la posición 250, y/o Leu o Phe para el aminoácido en la posición 428 según la numeración EU. Otra realización no limitante de esta modificación puede incluir Glu para el aminoácido en la posición 250, y/o Leu o Phe para el aminoácido en la posición 428.

Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como el dominio de unión a FcRn, una realización no limitante de la modificación que da como resultado el efecto de potenciar la unión a FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc inicial de la IgG1 humana incluye al menos dos o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

Asp o Glu para el aminoácido en la posición 251;

Tyr para el aminoácido en la posición 252;

Gln para el aminoácido en la posición 307;

Pro para el aminoácido en la posición 308;

5 Val para el aminoácido en la posición 378;

Ala para el aminoácido en la posición 380;

Leu para el aminoácido en la posición 428;

Ala o Lys para el aminoácido en la posición 430;

Ala, His, Ser o Tyr para el aminoácido en la posición 434; e

10 Ile para el aminoácido en la posición 436, indicado por la numeración EU. El número de aminoácidos que se van a modificar no está particularmente limitado; y el aminoácido se puede modificar en solo dos sitios o los aminoácidos se pueden modificar en tres o más sitios.

15 Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como el dominio de unión a FcRn, una realización no limitante de la modificación que da como resultado el efecto de potenciar la unión a FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc inicial de la IgG1 humana pueden ser modificaciones que incluyen Gln para el aminoácido en la posición 307, y Ala o Ser para el aminoácido en la posición 434 según la numeración EU. Otra realización no limitante de esta modificación puede incluir Pro para el aminoácido en la posición 308, y Ala para el aminoácido en la posición 434. Además, otra realización no limitante de esta modificación puede incluir Tyr para el aminoácido en la posición 252, y Ala para el aminoácido en la posición 434. Una
20 realización diferente no limitante de esta modificación puede incluir Val para el aminoácido en la posición 378, y Ala para el aminoácido en la posición 434. Otra realización diferente no limitante de esta modificación puede incluir Leu para el aminoácido en la posición 428, y Ala para el aminoácido en la posición 434. Otra realización diferente no limitante de esta modificación puede incluir Ala para el aminoácido en la posición 434, e Ile para el aminoácido en la posición 436. Además, otra realización no limitante de esta modificación puede incluir Pro para el aminoácido en la
25 posición 308, y Tyr para el aminoácido en la posición 434. Además, otra realización no limitante de esta modificación puede incluir Gln para el aminoácido en la posición 307, e Ile para el aminoácido en la posición 436.

30 Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como el dominio de unión a FcRn, una realización no limitante de la modificación que da como resultado el efecto de potenciar la unión a FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc inicial de la IgG1 humana pueden ser modificaciones que incluyen uno cualquiera de Gln para el aminoácido en la posición 307, Ala para el aminoácido en la posición 380, y Ser para el aminoácido en la posición 434 según la numeración EU. Otra realización no limitante de esta modificación puede incluir Gln para el aminoácido en la posición 307, Ala para el aminoácido en la posición 380, y Ala para el aminoácido en la posición 434. Además, otra realización no limitante de esta modificación puede incluir Tyr para el aminoácido en la posición 252, Pro para el aminoácido en la posición 308, y Tyr para el aminoácido en la
35 posición 434. Una realización diferente no limitante de esta modificación puede incluir Asp para el aminoácido en la posición 251, Gln para el aminoácido en la posición 307, e His para el aminoácido en la posición 434.

40 Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como el dominio de unión a FcRn, una realización no limitante de la modificación que da como resultado el efecto de potenciar la unión a FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc inicial de la IgG1 humana incluye la modificación de al menos dos o más aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

Leu para el aminoácido en la posición 238;

Leu para el aminoácido en la posición 244;

Arg para el aminoácido en la posición 245;

Pro para el aminoácido en la posición 249;

45 Tyr para el aminoácido en la posición 252;

Pro para el aminoácido en la posición 256;

Ala, Ile, Met, Asn, Ser o Val para el aminoácido en la posición 257;

Asp para el aminoácido en la posición 258;

Ser para el aminoácido en la posición 260;

- Leu para el aminoácido en la posición 262;
- Lys para el aminoácido en la posición 270;
- Leu o Arg para el aminoácido en la posición 272;
- Ala, Asp, Gly, His, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 279;
- 5 Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 283;
- Asn para el aminoácido en la posición 285;
- Phe para el aminoácido en la posición 286;
- Asn o Pro para el aminoácido en la posición 288;
- Val para el aminoácido en la posición 293;
- 10 Ala, Glu o Met para el aminoácido en la posición 307;
- Ala, Ile, Lys, Leu, Met, Val o Trp para el aminoácido en la posición 311;
- Pro para el aminoácido en la posición 312;
- Lys para el aminoácido en la posición 316;
- Pro para el aminoácido en la posición 317;
- 15 Asn o Thr para el aminoácido en la posición 318;
- Phe, His, Lys, Leu, Met, Arg, Ser o Trp para el aminoácido en la posición 332;
- Asn, Thr o Trp para el aminoácido en la posición 339;
- Pro para el aminoácido en la posición 341;
- Glu, His, Lys, Gln, Arg, Thr o Tyr para el aminoácido en la posición 343;
- 20 Arg para el aminoácido en la posición 375;
- Gly, Ile, Met, Pro, Thr o Val para el aminoácido en la posición 376;
- Lys para el aminoácido en la posición 377;
- Asp o Asn para el aminoácido en la posición 378;
- Asn, Ser o Thr para el aminoácido en la posición 380;
- 25 Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 382;
- Asn para el aminoácido en la posición 423;
- Asn para el aminoácido en la posición 427;
- Ala, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val o Tyr para el aminoácido en la posición 430;
- His o Asn para el aminoácido en la posición 431;
- 30 Phe, Gly, His, Trp o Tyr para el aminoácido en la posición 434;
- Ile, Leu o Thr para el aminoácido en la posición 436;
- Lys, Leu, Thr o Trp para el aminoácido en la posición 438;
- Lys para el aminoácido en la posición 440; y
- 35 Lys para el aminoácido en la posición 442 según la numeración EU. El número de aminoácidos que se van a modificar no está particularmente limitado y se puede modificar el aminoácido en solo dos sitios y se pueden modificar los aminoácidos en tres o más sitios.
- Cuando la región Fc de la IgG1 humana está comprendida como el dominio de unión a FcRn, una realización no limitante de la modificación que da como resultado el efecto de potenciar la unión a FcRn en unas condiciones de

intervalo de pH ácido en comparación con la actividad de unión de la región Fc inicial de la IgG1 humana pueden ser modificaciones que incluyen Ile para el aminoácido en la posición 257, e Ile para el aminoácido en la posición 311 según la numeración EU. Otra realización no limitante de esta modificación puede incluir Ile para el aminoácido en la posición 257, e His para el aminoácido en la posición 434. Otra realización no limitante de esta modificación puede incluir Val para el aminoácido en la posición 376, e His para el aminoácido en la posición 434.

Receptor Fcγ

El receptor Fcγ (FcγR) se refiere a un receptor capaz de unirse a la región Fc de anticuerpos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 monoclonales, e incluye todos los miembros que pertenecen a la familia de proteínas codificadas sustancialmente por un gen del receptor Fcγ. En seres humanos, la familia incluye FcγRI (CD64) que incluye las isoformas FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc; FcγRII (CD32) que incluye las isoformas FcγRIIa (que incluye el alotipo H131 y R131), FcγRIIb (que incluye FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2), y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16) que incluye las isoformas FcγRIIIa (que incluye el alotipo V158 y F158) y FcγRIIIb (que incluye el alotipo FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2); así como FcγR humanos no identificados, isoformas de FcγR, y sus alotipos. Sin embargo, el receptor Fcγ no está limitado a estos ejemplos. Sin estar limitados a los mismos, el FcγR incluye los derivados de seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. El FcγR puede derivar de cualquier organismo. El FcγR de ratón incluye, sin estar limitado a FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) y FcγRIII-2 (FcγRIV, CD16-2), así como todos los FcγR de ratón no identificados, isoformas de FcγR, y sus alotipos. Dichos receptores Fcγ preferidos incluyen, por ejemplo, FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), FcγRIIb (CD32), FcγRIIIa (CD16), y/o FcγRIIIb (CD16) humanos. La secuencia de polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de FcγRI se muestran en la SEQ ID NO: 18 (NM_000566.3) y 19 (NP_000557.1), respectivamente; la secuencia de polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de FcγRIIa se muestran en la SEQ ID NO: 20 (BC020823.1) y 21 (AAH20823.1), respectivamente; la secuencia de polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de FcγRIIb se muestran en la SEQ ID NO: 22 (BC146678.1) y 23 (AAI46679.1), respectivamente; la secuencia de polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de FcγRIIIa se muestran en la SEQ ID NO: 24 (BC033678.1) y 25 (AAH33678.1), respectivamente; y la secuencia de polinucleótido y la secuencia de aminoácidos de FcγRIIIb se muestran en la SEQ ID NO: 26 (BC128562.1) y 27 (AAI28563.1), respectivamente (el número de acceso a RefSeq se muestra en cada paréntesis). Se puede evaluar si un receptor Fcγ tiene actividad de unión a la región Fc de un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 monoclonal por cribado ALPHA (Ensayo homogéneo de luminiscencia amplificada por proximidad), método BIACORE basado en resonancia de plasmón de superficie (SPR), y otros (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2006) 103(11), 4005-4010), además de los formatos de FACS y ELISA descritos antes.

En FcγRI (CD64) que incluye FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc, y FcγRIII (CD16) que incluye las isoformas FcγRIIIa (que incluye los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (que incluye los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2), la cadena α que se une a la parte Fc de la IgG está asociada con la cadena γ común que tiene ITAM responsable de la transducción de la señal de activación intracelular. Por otro lado, el dominio citoplasmático de FcγRII (CD32) que incluye las isoformas FcγRIIa (que incluye los alotipos H131 y R131) y FcγRIIc contiene ITAM. Estos receptores son expresados en muchas células del sistema inmunitario tales como macrófagos, mastocitos y células presentadoras de antígeno. La señal de activación transducida tras la unión de estos receptores a la porción Fc de IgG da como resultado un aumento de la actividad fagocítica y la producción de citocinas inflamatorias de macrófagos, la desgranulación de mastocitos y la función mejorada de las células presentadoras de antígeno. Los receptores Fcγ que tienen la capacidad de transducir la señal de activación como se ha descrito antes también se denominan receptores Fcγ activadores.

Por otro lado, el dominio intracitoplasmático de FcγRIIb (que incluye FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2) contiene ITIM responsable de la transducción de señales inhibitorias. El entrecruzamiento entre FcγRIIb y el receptor de células B (BCR) en las células B suprime la señal de activación de BCR, lo que da como resultado la supresión de la producción de anticuerpos a través del BCR. El entrecruzamiento de FcγRIII y FcγRIIb en macrófagos suprime la actividad fagocítica y la producción de citoquinas inflamatorias. Los receptores Fcγ que tienen la capacidad de transducir la señal inhibitoria como se ha descrito antes también se denominan receptores Fcγ inhibidores.

Actividad de unión al receptor Fcγ

La actividad de unión de un dominio de unión a FcγR, que está incluido en una molécula de unión al antígeno de la presente descripción, a cualquiera de los receptores Fcγ humanos, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y/o FcγRIIIb, se puede confirmar por el formato FACS y ELISA descritos antes, así como el cribado ALPHA (Ensayo homogéneo de luminiscencia amplificada por proximidad), un método BIACORE que usa los fenómenos de resonancia de plasmón de superficie (SPR), y similares (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2006) 103 (11), 4005-4010).

El cribado ALPHA se realiza por la tecnología ALPHA basada en el principio que se describe a continuación que usa dos tipos de perlas: perlas donadoras yceptoras. Se detecta una señal luminiscente solo cuando las moléculas unidas a las perlas donadoras interaccionan biológicamente con las moléculas unidas a las perlasceptoras y cuando las dos perlas se encuentran muy cerca. El fotosensibilizador excitado por un rayo láser en una perla de donador convierte el oxígeno alrededor de la perla en oxígeno singlete excitado. Cuando el oxígeno singlete se difunde alrededor de las perlas donadoras y alcanza las perlasceptoras ubicadas muy cerca, se induce una reacción quimioluminiscente dentro de las perlasceptoras. Esta reacción finalmente da como resultado la emisión de luz. Si las moléculas unidas a las perlas donadoras no interaccionan con las moléculas unidas a las perlasceptoras, el oxígeno singlete producido por las perlas donadoras no llega a las perlasceptoras y no se produce una reacción

quimioluminiscente.

Por ejemplo, una molécula de unión al antígeno marcada con biotina que comprende un dominio de unión a FcγR se inmoviliza en las perlas donadoras y el receptor Fcγ marcado con glutatión S-transferasa (GST) se inmoviliza en las perlas aceptoras. En ausencia de una molécula de unión al antígeno que comprenda un dominio de unión a FcγR alterado competitivo, el receptor Fcγ interacciona con una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión a FcγR de tipo natural, induciendo una señal de 520 a 620 nm como resultado. La molécula de unión al antígeno que tiene un dominio de unión a FcγR alterado no marcado compite con la molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión a FcγR natural para la interacción con el receptor Fcγ. La afinidad de unión relativa se puede determinar cuantificando la reducción de la fluorescencia como resultado de la competición. Se conocen métodos para biotinilar las moléculas de unión al antígeno tales como anticuerpos que usan sulfo-NHS-biotina o similares. Los métodos adecuados para añadir el marcador GST a un receptor Fcγ incluyen métodos que implican la fusión de polipéptidos que codifican Fcγ y GST en el marco, expresan el gen fusionado usando células con un vector introducido al cual el gen está operativamente unido y después purificación usando una columna de glutatión. La señal inducida se puede analizar preferiblemente, por ejemplo, ajustándose a un modelo de competición de un sitio basado en análisis de regresión no lineal usando software tal como GRAPHPAD PRISM (GraphPad; San Diego).

Una de las sustancias para observar su interacción se inmoviliza como un ligando sobre la capa delgada de oro de un chip sensor. Cuando la luz se vierte sobre la superficie posterior del chip del sensor de modo que se produce la reflexión total en la interfase entre la capa delgada de oro y el vidrio, la intensidad de la luz reflejada se reduce parcialmente en un determinado sitio (señal SPR). La otra sustancia para observar su interacción se inyecta como un analito sobre la superficie del chip sensor. La masa de molécula de ligando inmovilizada aumenta cuando el analito se une al ligando. Esto altera el índice de refracción del disolvente en la superficie del chip sensor. El cambio en el índice de refracción provoca un desplazamiento posicional de la señal SPR (por el contrario, la disociación desplaza la señal de nuevo a la posición original). En el sistema Biacore, la cantidad de desplazamiento descrito antes (es decir, el cambio de masa sobre la superficie del chip sensor) se representa gráficamente en el eje vertical y, por lo tanto, el cambio de masa frente al tiempo se muestra como datos medidos (sensograma). Los parámetros cinéticos (constante de velocidad de asociación (k_a) y constante de velocidad de disociación (k_d)) se determinan a partir de la curva del sensograma, y la afinidad (K_D) se determina a partir de la relación entre estas dos constantes. El ensayo de inhibición también se usa preferiblemente en los métodos BIACORE. Se describen ejemplos de dicho ensayo de inhibición en *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2006) 103 (11), 4005-4010. Las actividades de unión del dominio de unión a FcγR incluido en la molécula de unión al antígeno de la presente descripción hacia cualquiera de los receptores Fcγ humanos, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y/o FcγRIIIb, se pueden determinar a partir de la cantidad de unión y el valor K_D para cada uno de los receptores Fcγ humanos calculados usando el sistema Biacore de acuerdo con los ejemplos descritos antes. En la presente memoria, la cantidad de unión de los diversos FcγR a los polipéptidos también está representada por los valores obtenidos al determinar la diferencia en los valores de RU de los sensogramas que cambiaban antes y después de la interacción de diferentes FcγR como analito con cada polipéptido, y dividiéndolos entre las diferencias en los valores de RU de los sensogramas que cambiaban antes y después de capturar polipéptidos en los chips sensores.

Se pueden usar adecuadamente unas condiciones de intervalo de pH ácido o unas condiciones de intervalo de pH neutro para las condiciones de pH para medir la actividad de unión al receptor Fcγ del dominio de unión a FcγR incluido en la molécula de unión al antígeno de la presente descripción o una molécula de unión al antígeno que contiene el dominio. Un intervalo de pH neutro como condiciones para medir la actividad de unión al receptor Fcγ del dominio de unión a FcγR de la presente descripción o una molécula de unión al antígeno que contiene el dominio en general se refiere de pH 6.7 a pH 10.0. Preferiblemente, es un intervalo indicado con valores de pH arbitrarios entre pH 7.0 y pH 8.0; y preferiblemente, se selecciona de pH 7.0, pH 7.1, pH 7.2, pH 7.3, pH 7.4, pH 7.5, pH 7.6, pH 7.7, pH 7.8, pH 7.9 y pH 8.0; y en particular preferiblemente, tiene un pH de 7.4, que está cerca del pH del plasma (sangre) in vivo. En la presente descripción, un intervalo de pH ácido como condiciones para el dominio de unión a FcγR de la presente descripción o una molécula de unión al antígeno que contiene el dominio para tener actividad de unión al receptor Fcγ en general se refiere de pH 4.0 a pH 6.5. Preferiblemente, se refiere de pH 5.5 a pH 6.5, y en particular preferiblemente, se refiere de pH 5.8 a pH 6.0, que están cerca del pH en el endosoma temprano in vivo. Con respecto a la temperatura usada como condiciones de medición, la afinidad de unión entre el dominio de unión a FcγR o una molécula de unión al antígeno que contiene el dominio y un receptor Fcγ humano se puede evaluar a cualquier temperatura entre 10°C y 50°C. Preferiblemente, se usa una temperatura entre 15°C y 40°C para determinar la afinidad de unión entre el dominio de unión a FcγR o una molécula de unión al antígeno que contiene el dominio y un receptor Fcγ. Más preferiblemente, se puede usar cualquier temperatura entre 20°C y 35°C tal como una cualquiera de 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C y 35°C de una manera similar para determinar la afinidad de unión entre el dominio de unión a FcγR o una molécula de unión al antígeno que contiene el dominio y un receptor Fcγ. Una temperatura de 25°C es un ejemplo no limitante en una realización de la presente descripción.

Dominio de unión a FcγR

Una molécula de unión al antígeno de la presente descripción comprende un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones, un dominio de unión al FcRn que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido, y un dominio de unión al receptor Fcγ que tiene actividad de unión selectiva a un receptor Fcγ (en lo sucesivo también denominado dominio de

unión a FcγR selectivo). Los ejemplos preferidos del dominio de unión a FcγR incluyen regiones Fc de inmunoglobulinas de tipo IgG, dominios de unión a FcγR de inmunoglobulinas de tipo IgG, anticuerpos anti-FcγR y moléculas anti-armazón de FcγR. Un dominio que originalmente tenía actividad de unión a FcγR se puede usar adecuadamente como está para el dominio. Cuando el dominio tiene una actividad de unión a FcγR débil o no tiene, la actividad de unión a FcγR se puede conferir alterando los aminoácidos que forman el dominio de unión a FcγR en la molécula de unión al antígeno. Alternativamente, la actividad de unión a FcγR se puede aumentar alterando los aminoácidos en el dominio que originalmente tenía actividad de unión a FcγR. Las alteraciones de aminoácidos del dominio de unión a FcγR que dan como resultado dicha actividad de unión deseada se pueden descubrir comparando la actividad de unión a FcγR antes y después de la alteración de aminoácidos. Una realización no limitante de dichos dominios de unión a FcγR es, por ejemplo, el dominio de unión a FcγR incluido en la región Fc de IgG1 (SEQ ID NO: 14), IgG2 (SEQ ID NO: 15), IgG3 (SEQ ID NO: 16) o IgG4 (SEQ ID NO: 17) humanas. Por ejemplo, cuando la región Fc de un anticuerpo IgG se usa como el dominio de unión al FcRn que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido, el dominio de unión al FcγR incluido en la región Fc se puede usar como el dominio de unión al FcγR.

Dominio de unión al FcγR que tiene actividad de unión selectiva a un receptor Fcγ

Se puede confirmar si un dominio de unión a FcγR de la presente descripción tiene o no actividad de unión selectiva comparando las actividades de unión con los respectivos receptores Fcγ, determinado por el método descrito en la sección mencionada antes sobre la actividad de unión a los receptores Fcγ. Se puede usar un dominio de unión a FcγR con mayor actividad de unión a receptores Fcγ inhibidores que a receptores Fcγ activadores como el dominio de unión a FcγR selectivo incluido en la molécula de unión al antígeno proporcionada por la presente descripción. En una realización no limitante, se puede usar un dominio de unión a FcγR con mayor actividad de unión a FcγRIIb (que incluye FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2) que a un receptor Fcγ activador seleccionado del grupo que consiste en FcγRI (CD64) que incluye FcγRIa, FcγRIb, FcγRIc, FcγRIII (CD16) que incluye las isoformas FcγRIIIa (que incluye los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (que incluye los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2), y FcγRII (CD32) que incluye las isoformas FcγRIIa y FcγRIIc (que incluye los alotipos H131 y R131) como el dominio de unión a FcγR selectivo incluido en una molécula de unión al antígeno proporcionada por la presente descripción. Además, en una realización no limitante de la presente descripción, se puede usar un dominio de unión a FcγR con mayor actividad de unión a FcγRIIb-1 y/o FcγRIIb-2 que a FcγRIa, FcγRIb, y FcγRIc, FcγRIIIa que incluye el alotipo V158, FcγRIIIa que incluye el alotipo F158, FcγRIIIb que incluye el alotipo FcγRIIIb-NA1, FcγRIIIb que incluye el alotipo FcγRIIIb-NA2, FcγRIIa que incluye el alotipo H131, FcγRIIa que incluye el alotipo R131, y/o FcγRIIc como un dominio de unión a FcγR selectivo incluido en una molécula de unión al antígeno proporcionada en la presente descripción. Se puede determinar si un dominio de unión a FcγR que se va a ensayar tiene actividad de unión selectiva a receptores Fcγ comparando el valor (relación) obtenido dividiendo los valores de KD del dominio de unión a FcγR para FcγRIa, FcγRIb, FcγRIc, FcγRIIIa que incluye el alotipo V158, FcγRIIIa que incluye el alotipo F158, FcγRIIIb que incluye el alotipo FcγRIIIb-NA1, FcγRIIIb que incluye el alotipo FcγRIIIb-NA2, FcγRIIa que incluye el alotipo H131, FcγRIIa que incluye el alotipo R131, y/o FcγRIIc entre los valores de KD para FcγRIIb-1 y/o FcγRIIb-2, en donde los valores de KD se determinan por el método descrito en la sección mencionada antes sobre la actividad de unión a receptores Fcγ, o más específicamente, comparando los índices de selectividad de FcγR en la ecuación 1.

Ecuación 1

Índice de selectividad de FcγR = valor de KD para FcγR activante / valor de KD para FcγR inhibidor

En la ecuación 1 mencionada antes, "FcγR activador" se refiere a FcγRIa, FcγRIb, FcγRIc, FcγRIIIa que incluye el alotipo V158, FcγRIIIa que incluye el alotipo F158, FcγRIIIb que incluye el alotipo FcγRIIIb-NA1, FcγRIIIb que incluye el alotipo FcγRIIIb-NA2, FcγRIIa que incluye el alotipo H131, FcγRIIa que incluye el alotipo R131 y/o FcγRIIc, y FcγR inhibidor se refiere a FcγRIIb-1 y/o FcγRIIb-2. Aunque el FcγR activador y el FcγR inhibidor usados para las mediciones del valor de KD se pueden seleccionar de cualquier combinación, en una realización no limitante, se puede usar un valor (relación) obtenido dividiendo el valor de KD para FcγRIIIa que incluye el alotipo H131 entre el valor de KD para FcγRIIb-1 y/o FcγRIIb-2.

Por ejemplo, los índices de selectividad de FcγR tienen los valores de 1.2 o mayor, 1.3 o mayor, 1.4 o mayor, 1.5 o mayor, 1.6 o mayor, 1.7 o mayor, 1.8 o mayor, 1.9 o mayor, 2 o mayor, 3 o mayor, 5 o mayor, 6 o mayor, 7 o mayor, 8 o mayor, 9 o mayor, 10 o mayor, 15 o mayor, 20 o mayor, 25 o mayor, 30 o mayor, 35 o mayor, 40 o mayor, 45 o mayor, 50 o mayor, 55 o mayor, 60 o mayor, 65 o mayor, 70 o mayor, 75 o mayor, 80 o mayor, 85 o mayor, 90 o mayor, 95 o mayor, 100 o mayor, 110 o mayor, 120 o mayor, 130 o mayor, 140 o mayor, 150 o mayor, 160 o mayor, 170 o mayor, 180 o mayor, 190 o mayor, 200 o mayor, 210 o mayor, 220 o mayor, 230 o mayor, 240 o mayor, 250 o mayor, 260 o mayor, 270 o mayor, 280 o mayor, 290 o mayor, 300 o mayor, 310 o mayor, 320 o mayor, 330 o mayor, 340 o mayor, 350 o mayor, 360 o mayor, 370 o mayor, 380 o mayor, 390 o mayor, 400 o mayor, 410 o mayor, 420 o mayor, 430 o mayor, 440 o mayor, 450 o mayor, 460 o mayor, 470 o mayor, 480 o mayor, 490 o mayor, 500 o mayor, 520 o mayor, 540 o mayor, 560 o mayor, 580 o mayor, 600 o mayor, 620 o mayor, 640 o mayor, 660 o mayor, 680 o mayor, 700 o mayor, 720 o mayor, 740 o mayor, 760 o mayor, 780 o mayor, 800 o mayor, 820 o mayor, 840 o mayor, 860 o mayor, 880 o mayor, 900 o mayor, 920 o mayor, 940 o mayor, 960 o mayor, 980 o mayor, 1000 o mayor, 1500 o mayor, 2000 o mayor, 2500 o mayor, 3000 o mayor, 3500 o mayor, 4000 o mayor, 4500 o mayor, 5000 o mayor, 5500 o mayor, 6000 o mayor, 6500 o mayor, 7000 o mayor, 7500 o mayor, 8000 o mayor, 8500 o mayor, 9000 o mayor, 9500 o mayor,

10 000 o mayor, o 100 000 o mayor.

Una realización no limitante del dominio de unión a FcγR selectivo en una molécula de unión al antígeno de la presente descripción incluye, por ejemplo, regiones Fc producidas modificando el dominio de unión a FcγR incluido en una región Fc presentada como IgG1 (SEQ ID NO: 14), IgG2 (SEQ ID NO: 15), IgG3 (SEQ ID NO: 16), o IgG4 (SEQ ID NO: 17) humanas. Un ejemplo de un método para producir las regiones Fc modificadas incluye el método descrito en la sección mencionada antes sobre alteraciones de aminoácidos. Los ejemplos de dichas regiones Fc alteradas incluyen una región Fc en la que el aminoácido en la posición 238 (numeración EU) es Asp o una región Fc en la que el aminoácido en la posición 328 (numeración EU) es Glu en una IgG humana (IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). Una región Fc en la que el aminoácido en la posición 238 (numeración EU) es Asp o una región Fc en la que el aminoácido en la posición 328 (numeración EU) es Glu en una IgG humana (IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), y moléculas de unión al antígeno que contienen dicha región Fc muestran mayor actividad de unión a FcγRIIb-1 y/o FcγRIIb-2 que a FcγRIa, FcγRIb, FcγRIc, FcγRIIIa que incluye el alotipo V158, FcγRIIIa que incluye el alotipo F158, FcγRIIb que incluye el alotipo FcγRIIb-NA1, FcγRIIb que incluye el alotipo FcγRIIb-NA2, FcγRIIIa que incluye el alotipo H131, FcγRIIIa que incluye el alotipo R131 y/o FcγRIIc.

Las regiones Fc que contienen un dominio de unión a FcγR selectivo que están incluidas en la molécula de unión al antígeno de la presente descripción y las moléculas de unión al antígeno que contienen dicha región Fc también pueden ser regiones Fc y moléculas de unión al antígeno que contienen dicha región Fc que mantienen o muestran menor actividad de unión al FcγR activador (FcγRIa, FcγRIb, FcγRIc, FcγRIIIa que incluye el alotipo V158, FcγRIIIa que incluye el alotipo F158, FcγRIIb que incluye el alotipo FcγRIIb-NA1, FcγRIIb que incluye el alotipo FcγRIIb-NA2, FcγRIIIa que incluye el alotipo H131, FcγRIIIa que incluye el alotipo R131, y/o FcγRIIc) cuando se compara con una región Fc presentada como IgG1 (SEQ ID NO: 14), IgG2 (SEQ ID NO: 15), IgG3 (SEQ ID NO: 16) o IgG4 (SEQ ID NO: 17) humana (en lo sucesivo denominada una región Fc de tipo natural) y una molécula de unión al antígeno que contiene dicha región Fc de tipo natural.

Comparado con una región Fc de tipo natural y una molécula de unión al antígeno que contiene una región Fc de tipo natural, el grado de reducción mencionado antes en la actividad de unión al FcγR activador de una región Fc que contiene un dominio de unión a FcγR selectivo incluido en una molécula de unión al antígeno de la presente descripción, y una molécula de unión al antígeno que contiene dicha región Fc es, por ejemplo, 99% o menor, 98% o menor, 97% o menor, 96% o menor, 95% o menor, 94% o menor, 93% o menor, 92% o menor, 91% o menor, 90% o menor, 88% o menor, 86% o menor, 84% o menor, 82% o menor, 80% o menor, 78% o menor, 76% o menor, 74% o menor, 72% o menor, 70% o menor, 68% o menor, 66% o menor, 64% o menor, 62% o menor, 60% o menor, 58% o menor, 56% o menor, 54% o menor, 52% o menor, 50% o menor, 45% o menor, 40% o menor, 35% o menor, 30% o menor, 25% o menor, 20% o menor, 15% o menor, 10% o menor, 5% o menor, 4% o menor, 3% o menor, 2% o menor, 1% o menor, 0.5% o menor, 0.4% o menor, 0.3% o menor, 0.2% o menor, 0.1% o menor, 0.05% o menor, 0.01% o menor, o 0.005% o menor.

Las regiones Fc que contienen un dominio de unión a FcγR selectivo y moléculas de unión al antígeno que contienen dicha región, que están incluidas en la molécula de unión al antígeno de la presente descripción, también pueden ser regiones Fc y moléculas de unión al antígeno que contienen dicha región Fc que muestran mayor actividad de unión al FcγR inhibidor (FcγRIIb-1 y/o FcγRIIb-2) en comparación con una región Fc presentada como IgG1 (SEQ ID NO: 14), IgG2 (SEQ ID NO: 15), IgG3 (SEQ ID NO: 16), o IgG4 (SEQ ID NO: 17) humanas (en lo sucesivo denominada una región Fc de tipo natural) y una molécula de unión al antígeno que contiene dicha región Fc de tipo natural.

Comparado con una región Fc de tipo natural y una molécula de unión al antígeno que contiene una región Fc de tipo natural, el grado de aumento mencionado antes en la actividad de unión al FcγR inhibidor de una región Fc que contiene un dominio de unión a FcγR selectivo incluido en una molécula de unión al antígeno de la presente descripción, y una molécula de unión al antígeno que contiene dicha región Fc es, por ejemplo, 101% o mayor, 102% o mayor, 103% o mayor, 104% o mayor, 105% o mayor, 106% o mayor, 107% o mayor, 108% o mayor, 109% o mayor, 110% o mayor, 112% o mayor, 114% o mayor, 116% o mayor, 118% o mayor, 120% o mayor, 122% o mayor, 124% o mayor, 126% o mayor, 128% o mayor, 130% o mayor, 132% o mayor, 134% o mayor, 136% o mayor, 138% o mayor, 140% o mayor, 142% o mayor, 144% o mayor, 146% o mayor, 148% o mayor, 150% o mayor, 155% o mayor, 160% o mayor, 165% o mayor, 170% o mayor, 175% o mayor, 180% o mayor, 185% o mayor, 190% o mayor, 195% o mayor, 2 veces o mayor, 3 veces o mayor, 4 veces o mayor, 5 veces o mayor, 6 veces o mayor, 7 veces o mayor, 8 veces o mayor, 9 veces o mayor, 10 veces o mayor, 20 veces o mayor, 30 veces o mayor, 40 veces o mayor, 50 veces o mayor, 60 veces o mayor, 70 veces o mayor, 80 veces o mayor, 90 veces o mayor, 100 veces o mayor, 200 veces o mayor, 300 veces o mayor, 400 veces o mayor, 500 veces o mayor, 600 veces o mayor, 700 veces o mayor, 800 veces o mayor, 900 veces o mayor, 1000 veces o mayor, 10 000 veces o mayor, o 100 000 veces o mayor.

Además, la región Fc que contiene un dominio de unión a FcγR selectivo incluido en una molécula de unión al antígeno de la presente descripción y la molécula de unión al antígeno que contiene dicha región Fc puede ser una región Fc y una molécula de unión al antígeno que contiene dicha región Fc que mantiene o muestra una actividad de unión reducida al FcγR activador (FcγRIa, FcγRIb, FcγRIc, FcγRIIIa que incluye el alotipo V158, FcγRIIIa que incluye el alotipo F158, FcγRIIb que incluye el alotipo FcγRIIb-NA1, FcγRIIb que incluye el alotipo FcγRIIb-NA2, FcγRIIIa que incluye el alotipo H131, FcγRIIIa que incluye el alotipo R131, y/o FcγRIIc) cuando se compara con una región Fc presentada como IgG1 (SEQ ID NO: 14), IgG2 (SEQ ID NO: 15), IgG3 (SEQ ID NO: 16), o IgG4 (SEQ ID NO: 17)

humana (en lo sucesivo denominada una región Fc de tipo natural) y una molécula de unión al antígeno que contiene dicha región Fc de tipo natural; y muestra una actividad de unión mejorada a FcγR inhibidor (FcγRIIb-1 y/o FcγRIIb-2) cuando se compara con una región Fc presentada como IgG1 (SEQ ID NO: 14), IgG2 (SEQ ID NO: 15), IgG3 (SEQ ID NO: 16) o IgG4 (SEQ ID NO: 17) humana (en lo sucesivo denominada una región Fc de tipo natural) y una molécula de unión al antígeno que contiene dicha región Fc de tipo natural.

Además, la región Fc que contiene un dominio de unión a FcγR selectivo incluido en una molécula de unión al antígeno de la presente descripción y la molécula de unión al antígeno que contiene dicha región Fc puede ser una región Fc y una molécula de unión al antígeno que contiene dicha región Fc con un grado mayor de mejora de la actividad de unión a un receptor Fcγ inhibidor (FcγRIIb-1 y/o FcγRIIb-2) que a un receptor Fcγ activador (FcγRIa, FcγRIb, FcγRIc, FcγRIIIa que incluye el alotipo V158, FcγRIIIa que incluye el alotipo F158, FcγRIIIb que incluye el alotipo FcγRIIIb-NA1, FcγRIIIb que incluye el alotipo FcγRIIIb-NA2, FcγRIIIa que incluye el alotipo H131, FcγRIIIa que incluye el alotipo R131), cuando se compara con una región Fc presentada como IgG1 (SEQ ID NO: 14), IgG2 (SEQ ID NO: 15), IgG3 (SEQ ID NO: 16), o IgG4 (SEQ ID NO: 17) humana (en lo sucesivo denominada región Fc de tipo natural) y una molécula de unión al antígeno que contiene dicha región Fc de tipo natural.

En la presente descripción, se puede añadir al menos otra alteración de la región Fc a la región Fc en la que el aminoácido en la posición 238 (numeración EU) es Asp y a la región Fc en la que el aminoácido en la posición 328 (numeración EU) es Glu, por las realizaciones y similares descritas en la sección mencionada antes sobre alteraciones de aminoácidos. Además de estas alteraciones, se pueden añadir también alteraciones adicionales. Las alteraciones adicionales se pueden seleccionar de cualquiera de las sustituciones, eliminaciones y modificaciones de un aminoácido y sus combinaciones. Por ejemplo, se pueden añadir alteraciones que potencian la actividad de unión a FcγRIIIa (tipo H) y FcγRIIIa (tipo R). La adición de dichas alteraciones mejora la selectividad de unión de FcγRIIb frente a FcγRIIIa.

Entre estas, las alteraciones que mejoran la selectividad de unión de FcγRIIb frente a FcγRIIIa (tipo R) son favorables, y las alteraciones que mejoran la selectividad de unión de FcγRIIb frente a FcγRIIIa (tipo H) son más favorables. Los ejemplos de sustituciones de aminoácidos preferidas para dichas alteraciones incluyen: una alteración por sustitución de Gly en la posición 237 (numeración EU) por Trp; una alteración por sustitución de Gly en la posición 237 (numeración EU) por Phe; una alteración por sustitución de Pro en la posición 238 (numeración EU) por Phe; una alteración por sustitución de Asn en la posición 325 (numeración EU) por Met; una alteración por sustitución de Ser en la posición 267 (numeración EU) por Ile; una alteración por sustitución de Leu en la posición 328 (numeración EU) por Asp; una alteración por sustitución de Ser en la posición 267 (numeración EU) por Val; una alteración por sustitución de Leu en la posición 328 (numeración EU) por Trp; una alteración por sustitución de Ser en la posición 267 (numeración EU) por Gln; una alteración por sustitución de Ser en la posición 267 (numeración EU) por Met; una alteración por sustitución de Gly en la posición 236 (numeración EU) por Asp; una alteración por sustitución de Ala en la posición 327 (numeración EU) por Asn; una alteración por sustitución de Asn en la posición 325 (numeración EU) por Ser; una alteración por sustitución de Leu en la posición 235 (numeración EU) por Tyr; una alteración por sustitución de Val en la posición 266 (numeración EU) por Met; una alteración por sustitución de Leu en la posición 328 (numeración EU) por Tyr; una alteración por sustitución de Leu en la posición 235 (numeración EU) por Trp; una alteración por sustitución de Leu en la posición 235 (numeración EU) por Phe; una alteración por sustitución de Ser en la posición 239 (numeración EU) por Gly; una alteración por sustitución de Ala en la posición 327 (numeración EU) por Glu; una alteración por sustitución de Ala en la posición 327 (numeración EU) por Gly; una alteración por sustitución de Pro en la posición 238 (numeración EU) por Leu; una alteración por sustitución de Ser en la posición 239 (numeración EU) por Leu; una alteración por sustitución de Leu en la posición 328 (numeración EU) por Thr; una alteración por sustitución de Leu en la posición 328 (numeración EU) por Ser; una alteración por sustitución de Leu en la posición 328 (numeración EU) por Met; una alteración por sustitución de Pro en la posición 331 (numeración EU) por Trp; una alteración por sustitución de Pro en la posición 331 (numeración EU) por Tyr; una alteración por sustitución de Pro en la posición 331 (numeración EU) por Phe; una alteración por sustitución de Ala en la posición 327 (numeración EU) por Asp; una alteración por sustitución de Leu en la posición 328 (numeración EU) por Phe; una alteración por sustitución de Pro en la posición 271 (numeración EU) por Leu; una alteración por sustitución de Ser en la posición 267 (numeración EU) por Glu; una alteración por sustitución de Leu en la posición 328 (numeración EU) por Ala; una alteración por sustitución de Leu en la posición 328 (numeración EU) por Ile; una alteración por sustitución de Leu en la posición 328 (numeración EU) por Gln; una alteración por sustitución de Leu en la posición 328 (numeración EU) por Val; una alteración por sustitución de Lys en la posición 326 (numeración EU) por Trp; una alteración por sustitución de Lys en la posición 334 (numeración EU) por Arg; una alteración por sustitución de His en la posición 268 (numeración EU) por Gly; una alteración por sustitución de His en la posición 268 (numeración EU) por Asn; una alteración por sustitución de Ser en la posición 324 (numeración EU) por Val; una alteración por sustitución de Val en la posición 266 (numeración EU) por Leu; una alteración por sustitución de Pro en la posición 271 (numeración EU) por Gly; una alteración por sustitución de Ile en la posición 332 (numeración EU) por Phe; una alteración por sustitución de Ser en la posición 324 (numeración EU) por Ile; una alteración por sustitución de Glu en la posición 333 (numeración EU) por Pro; una alteración por sustitución de Tyr en la posición 300 (numeración EU) por Asp; una alteración por sustitución de Ser en la posición 337 (numeración EU) por Asp; una alteración por sustitución de Tyr en la posición 300 (numeración EU) por Gln; una alteración por sustitución de Thr en la posición 335 (numeración EU) por Asp; una alteración por sustitución de Ser en la posición 239 (numeración EU) por Asn; una alteración por sustitución de Lys en la posición 326 (numeración EU) por Leu; una alteración por sustitución de Lys en

[illegible]

Las sustituciones de aminoácidos favorables entre estas alteraciones son, por ejemplo, una alteración por sustitución de Gly en la posición 237 (numeración EU) por Trp; una alteración por sustitución de Gly en la posición 237 (numeración EU) por Phe; una alteración por sustitución de Ser en la posición 267 (numeración EU) por Val; una alteración por sustitución de Ser en la posición 267 (numeración EU) por Gln; una alteración por sustitución de His en la posición 268 (numeración EU) por Asn; una alteración por sustitución de Pro en la posición 271 (numeración EU) por Gly; una alteración por sustitución de Lys en la posición 326 (numeración EU) por Leu; una alteración por sustitución de Lys en la posición 326 (numeración EU) por Gln; una alteración por sustitución de Lys en la posición 326 (numeración EU) por Glu; una alteración por sustitución de Lys en la posición 326 (numeración EU) por Met; una alteración por sustitución de Ser en la posición 239 (numeración EU) por Asp; una alteración por sustitución de Ser en la posición 267 (numeración EU) por Ala; una alteración por sustitución de Leu en la posición 234 (numeración EU) por Trp; una alteración por sustitución de Leu en la posición 234 (numeración EU) por Tyr; una alteración por sustitución de Gly en la posición 237 (numeración EU) por Ala; una alteración por sustitución de Gly en la posición 237 (numeración EU) por Asp; una alteración por sustitución de Gly en la posición 237 (numeración EU) por Glu; una alteración por sustitución de Gly en la posición 237 (numeración EU) por Leu; una alteración por sustitución de Gly en la posición 237 (numeración EU) por Met; una alteración por sustitución de Gly en la posición 237 (numeración EU) por Tyr; una alteración por sustitución de Ala en la posición 330 (numeración EU) por Lys; una alteración por sustitución de Ala en la posición 330 (numeración EU) por Arg; una alteración por sustitución de Glu en la posición 233 (numeración EU) por Asp; una alteración por sustitución de His en la posición 268 (numeración EU) por Asp; una alteración por sustitución de His en la posición 268 (numeración EU) por Glu; una alteración por sustitución de Lys en la posición 326 (numeración EU) por Asp; una alteración por sustitución de Lys en la posición 326 (numeración EU) por Ser; una alteración por sustitución de Lys en la posición 326 (numeración EU) por Thr; una alteración por sustitución de Val en la posición 323 (numeración EU) por Ile; una alteración por sustitución de Val en la posición 323 (numeración EU) por Leu; una alteración por sustitución de Val en la posición 323 (numeración EU) por Met; una alteración por sustitución de Tyr en la posición 296 (numeración EU) por Asp; una alteración por sustitución de Lys en la posición 326 (numeración EU) por Ala; una alteración por sustitución de Lys en la posición 326 (numeración EU)

por Asn; y una alteración por sustitución de Ala en la posición 330 (numeración EU) por Met.

La alteración mencionada antes puede estar en una posición, o se pueden combinar alteraciones en dos o más posiciones. Ejemplos favorables de dichas alteraciones son las descritas en las Tablas 13 a 14, Tablas 16 a 23 y Tablas 25 a 27.

- 5 La región Fc producida alterando el dominio de unión a FcγR incluido en la región Fc presentada como IgG1 (SEQ ID NO: 14), IgG2 (SEQ ID NO: 15), IgG3 (SEQ ID NO: 16) o IgG4 (SEQ ID NO: 17) humana se puede dar como un ejemplo de otra realización no limitante del dominio de unión a FcγR selectivo incluido en las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción. Un método para producir las regiones Fc modificadas es, por ejemplo, el método descrito en la sección mencionada antes sobre alteraciones de aminoácidos. Los ejemplos de dichas regiones Fc alteradas incluyen una región Fc en la que el aminoácido en la posición 238 (numeración EU) es Asp y el aminoácido en la posición 271 (numeración EU) es Gly en una IgG humana (IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4). Una región Fc en la que el aminoácido en la posición 238 (numeración EU) es Asp y el aminoácido en la posición 271 (numeración EU) es Gly en una IgG humana (IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) y las moléculas de unión al antígeno que contienen dicha región Fc muestra una mayor actividad de unión a FcγRIIb-1 y/o FcγRIIb-2 que a FcγRIa, FcγRIb, FcγRIc, FcγRIIIa que incluye el alotipo V158, FcγRIIIa que incluye el alotipo F158, FcγRIIIb que incluye el alotipo FcγRIIIb-NA1, FcγRIIIb que incluye el alotipo FcγRIIIb-NA2, FcγRIIIa que incluye el alotipo H131, FcγRIIIa que incluye el alotipo R131, y/o FcγRIIc.

- En la presente descripción, al menos otra alteración a la región Fc se puede añadir a la región Fc en la que el aminoácido en la posición 238 (numeración EU) es Asp y el aminoácido en la posición 271 (numeración EU) es Gly, por las realizaciones y similares descritos en la sección mencionada sobre alteraciones de aminoácidos. Además de estas alteraciones, también se pueden añadir alteraciones adicionales. Las alteraciones adicionales se pueden seleccionar de cualquiera de las sustituciones, eliminaciones y modificaciones de un aminoácido, y sus combinaciones. Por ejemplo, se pueden añadir alteraciones que mantienen o reducen la actividad de unión a receptores Fcγ activadores (FcγRIa, FcγRIb, FcγRIc, FcγRIIIa que incluye el alotipo V158, FcγRIIIa que incluye el alotipo F158, FcγRIIIb que incluye el alotipo FcγRIIIb-NA1, FcγRIIIb que incluye el alotipo FcγRIIIb-NA2, FcγRIIIa que incluye el alotipo H131, FcγRIIIa que incluye el alotipo R131). Se pueden añadir alteraciones que aumentan la actividad de unión a receptores Fcγ inhibidores (FcγRIIb-1 y/o FcγRIIb-2) mientras se mantiene o reduce la actividad de unión a FcγRIIIa (tipo H) y FcγRIIIa (tipo R). Además, también se pueden añadir alteraciones donde el grado de aumento de la actividad de unión a receptores Fcγ inhibidores (FcγRIIb-1 y/o FcγRIIb-2) es mayor que el grado de aumento de la actividad de unión a receptores Fcγ activadores (FcγRIa, FcγRIb, FcγRIc, FcγRIIIa que incluye el alotipo V158, FcγRIIIa que incluye el alotipo F158, FcγRIIIb que incluye el alotipo FcγRIIIb-NA1, FcγRIIIb que incluye el alotipo FcγRIIIb-NA2, FcγRIIIa que incluye el alotipo H131, FcγRIIIa que incluye el alotipo R131). La adición de dichas alteraciones mejora la selectividad de unión a FcγRIIb frente a FcγRIIIa.

- Un ejemplo de una realización no limitante de la región Fc alterada que comprende un dominio de unión a FcγR selectivo incluye una región Fc alterada en la que al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en los de las posiciones 233, 234, 237, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 272, 274, 296, 326, 327, 330, 331, 332, 333, 355, 356, 358, 396, 409 y 419 (numeración EU) están sustituidos en la región Fc en la que el aminoácido en la posición 238 (numeración EU) es Asp y el aminoácido en la posición 271 (numeración EU) es Gly en una IgG humana (IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4).

- Además, un ejemplo de una realización no limitante de la región Fc alterada que comprende un dominio de unión a FcγR selectivo es una región Fc alterada que comprende uno cualquiera o más de

Asp en la posición del aminoácido 233,

Tyr en la posición del aminoácido 234,

Asp en la posición de aminoácido 237,

Ile en la posición del aminoácido 264,

- 45 Glu en la posición del aminoácido 265,

uno cualquiera de Phe, Met y Leu en la posición del aminoácido 266,

uno cualquiera de Ala, Glu, Gly y Gln en la posición del aminoácido 267,

uno cualquiera de Asp, Glu y Gln en la posición del aminoácido 268,

Asp en la posición de aminoácido 269,

- 50 uno cualquiera de Asp, Phe, Ile, Met, Asn, Pro y Gln en la posición de aminoácido 272,

Gln en la posición 274,

Asp o Phe en la posición del aminoácido 296,

- Ala o Asp en la posición del aminoácido 326,
 Gly en la posición del aminoácido 327,
 Lys o Arg en la posición del aminoácido 330,
 Ser en la posición del aminoácido 331,
 5 Thr en la posición del aminoácido 332,
 uno cualquiera de Thr, Lys y Arg en la posición del aminoácido 333,
 Gln en la posición de aminoácido 355,
 Glu en la posición de aminoácido 356,
 Met en la posición de aminoácido 358,
 10 uno cualquiera de Asp, Glu, Phe, Ile, Lys, Leu, Met, Gln, Arg y Tyr en la posición del aminoácido 396,
 Arg en la posición de aminoácido 409,
 Glu en la posición de aminoácido 419,
 mostrado por la numeración EU, en la región Fc en la que el aminoácido en la posición 238 es Asp y el aminoácido en la posición 271 (numeración EU) es Gly en una IgG humana (IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4).
 15 Los ejemplos de una realización no limitante de la región Fc que comprende además al menos otra alteración a la región Fc y comprende además alteraciones adicionales mencionadas antes, incluyen regiones Fc mostradas en las Tablas 5-1 a 5-7.

Tabla 5-1

Región Fc alterada	Aminoácido alterado (numeración EU)
BP208	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R
BP209	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R
BP210	G237D/P238D/H268D/P271G/A330R
BP211	E233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R
BP212	E233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R
BP213	E233D/P238D/H268D/P271G/A330R
BP214	E233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326D/A330K
BP215	G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K
BP216	G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/A330K
BP217	G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330K
BP218	G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330K
BP219	L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K
BP220	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K
BP221	L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330R
BP222	L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330R
BP223	L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R
BP224	L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/K326A/A330R
BP225	L234Y/G237D/P238D/K326D/A330R
BP226	L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330R
BP227	L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330R
BP228	L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/K326D/A330R
BP229	E233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330R
BP230	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R
BP231	G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R

Región Fc alterada	Aminoácido alterado (numeración EU)
BP232	L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330K
BP233	L234Y/G237D/P238D/P271G/A330K
BP234	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330K
BP235	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R
BP236	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R
BP237	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330K

(La Tabla 5-2 es una tabla continuación de la Tabla 5-1)

Tabla 5-2

Región Fc alterada	Aminoácido alterado (numeración EU)
BP238	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R
BP239	E233D/L234Y/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R
BP240	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/A330R
BP241	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330R
BP242	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R
BP243	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R
BP244	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330R
BP245	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R
BP246	E233D/G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R
BP247	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R
BP248	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R
BP249	E233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R
BP262	G237D/P238D/H268E/P271G
BP264	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D/A330R
BP265	G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D/A330R
BP266	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/A330R
BP267	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G
BP268	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D
BP269	G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D
BP300	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G
BP313	E233D/G237D/P238D/D265E/H268E/P271G
BP333	E233D/G237D/P238D/V266F/H268E/P271G
BP338	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/P271G
BP339	E233D/G237D/P238D/V266M/H268E/P271G
BP348	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G
BP350	E233D/G237D/P238D/S267E/H268E/P271G
BP352	E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/P271G
BP367	E233D/G237D/P238D/H268E/E269D/P271G
BP384	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/K334R
BP390	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/I332S
BP391	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/I332T

5 (La Tabla 5-3 es una tabla continuación de la Tabla 5-2)

Tabla 5-3

Región Fc alterada	Aminoácido alterado (numeración EU)
BP392	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/I332K
BP393	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/I332R
BP423	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R
BP425	E233D/G237D/P238D/V266L/S267A/H268E/P271G/A330R
BP426	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269D/P271G/A330R
BP427	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269Y/P271G/A330R
BP428	E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/A330R
BP429	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/A330R
BP430	E233D/G237D/P238D/V266L/S267G/H268E/P271G/A330R
BP431	E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/E269D/P271G/A330R
BP432	E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/E269Y/P271G/A330R
BP433	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K/I332T
BP434	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330R/I332T
BP435	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326A/A330R/I332T
BP436	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/I332T
BP437	G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/I332T
BP438	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/I332T
BP439	E233D/G237D/P238D/V264I/V266L/S267A/H268E/P271G/A330R
BP440	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/A330R
BP441	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/P271G/A330R
BP442	E233D/G237D/P238D/H268E/E269D/P271G/A330R
BP443	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/E269D/P271G/A330R
BP444	E233D/G237D/P238D/H268E/E269N/P271G/A330R
BP445	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R
BP446	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269N/P271G/A330R
BP447	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396A
BP448	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396D
BP449	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396E
BP450	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396F
BP451	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396G
BP452	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330P/P396H

(La Tabla 5-4 es una tabla continuación de la Tabla 5-3)

Tabla 5-4

Región Fc alterada	Aminoácido alterado (numeración EU)
BP453	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396I
BP454	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396K
BP455	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396L
BP456	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396M
BP457	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396N
BP458	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396Q
BP459	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396R
BP460	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396S

ES 2 795 419 T3

Región Fc alterada	Aminoácido alterado (numeración EU)
BP461	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396T
BP462	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396V
BP463	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396W
BP464	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/P396Y
BP465	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/E333K
BP466	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/E333R
BP467	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/E334S
BP468	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/E334T
BP469	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/E333S
BP470	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/E333T
BP471	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/P331S
BP472	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330S
BP473	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A327G/A330R
BP474	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/P331S
BP475	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A327G/A330S
BP476	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A327G/A330S/P331S
BP477	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A327G/A330R/P331S
BP478	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R S131C/K133R/G137E/G138S/Q196K/1199T/N203D/K214R/P217S + ELIMINACIÓN 219- 221 + K222Y/T223G/H224P/T225P
BP479	E233D/G237D/P238D/V264I/V266L/S267A/I1268E/P271G
BP480	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/E269D/P271G
BP481	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/I1268E/P271G

(La Tabla 5-5 es una tabla continuación de la Tabla 5-4)

Tabla 5-5

Región Fc alterada	Aminoácido alterado (numeración EU)
BP482	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269N/P271G
BP483	E233D/G237D/P238D/V266L/S267A/H268E/P271G
BP484	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269D/P271G
BP485	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269Y/P271G
BP487	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R/P396M
BP488	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R
BP489	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M
BP490	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R
BP491	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R
BP492	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G
BP493	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D
BP494	G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R
BP495	G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R
BP496	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D
BP497	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A327G/A330R
BP498	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R/P396L
BP499	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L

ES 2 795 419 T3

Región Fc alterada	Aminoácido alterado (numeración EU)
BP500	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D
BP501	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G
BP502	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R
BP503	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M
BP504	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P
BP505	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D
BP506	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R
BP507	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/A330R
BP508	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D
BP509	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D
BP510	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/A330R
BP511	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R
BP513	E233D/G237D/P238D/H268E/E272D/P271G

(La Tabla 5-6 es una tabla continuación de la Tabla 5-5)

Tabla 5-6

Región Fc alterada	Aminoácido alterado (numeración EU)
BP514	E233D/G237D/P238D/H268E/E272F/P271G
BP517	E233D/G237D/P238D/H268E/E272I/P271G
BP520	E233D/G237D/P238D/H268E/E272M/P271G
BP521	E233D/G237D/P238D/H268E/E272N/P271G
BP523	E233D/G237D/P238D/H268E/E272Q/P271G
BP531	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M
BP532	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M
BP533	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L
BP534	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L
BP535	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M
BP536	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M
BP537	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/A330R
BP538	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/A330R
BP539	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R
BP540	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/E272P/Y296D/A330R
BP549	G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/A330R
BP550	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP551	G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP552	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP553	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/A330R
BP554	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/A330R
BP555	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP556	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R
BP557	G237D/P238D/S267G/H268D/P271G/Y296D/A330R
BP558	G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/E272D/A330R
BP559	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/E272D/Y296D
BP560	P238D/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R

Región Fc alterada	Aminoácido alterado (numeración EU)
BP561	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP562	G237D/P238D/H268D/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP563	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R

(La Tabla 5-7 es una tabla continuación de la Tabla 5-6)

Tabla 5-7

Región Fc alterada	Aminoácido alterado (numeración EU)
BP564	G237D/P238D/H268E/P271G/E272D/Y296D/A330R
BP565	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R
BP567	E233D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D
BP568	E233D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G

5 Molécula de unión al antígeno

En la presente descripción, "una molécula de unión al antígeno" se usa en el sentido más amplio para referirse a una molécula que comprende un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones, un dominio de unión al FcRn que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido, y un dominio de unión al receptor Fcγ que tiene actividad de unión selectiva a un receptor Fcγ (un dominio de unión a FcγR selectivo). Específicamente, las moléculas de unión al antígeno incluyen varios tipos de moléculas siempre que presenten actividad de unión al antígeno. Los anticuerpos son ejemplos de moléculas en las que un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones, un dominio de unión al FcRn que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido y un dominio de unión al receptor Fcγ que tiene actividad de unión selectiva a un receptor Fcγ (un dominio de unión a FcγR selectivo) están unidos entre sí. Los anticuerpos pueden incluir anticuerpos monoclonales individuales (que incluyen anticuerpos agonistas y anticuerpos antagonistas), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y similares. Alternativamente, cuando se usan como fragmentos de anticuerpos, incluyen preferiblemente dominios de unión al antígeno y fragmentos de unión al antígeno (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, scFv y Fv). Se usan moléculas de armazón donde las estructuras tridimensionales, tales como la estructura de proteína de barril α/β estable ya conocida, como armazón (base) y solo algunas partes de las estructuras se convierten en bibliotecas para construir dominios de unión al antígeno y también se incluyen en las moléculas de unión antígeno de la presente descripción.

Una molécula de unión al antígeno de la presente descripción puede contener al menos algunas porciones de una región Fc que media la unión al FcRn y la unión al receptor Fcγ y/o al receptor del complemento. En una realización no limitante, la molécula de unión al antígeno incluye, por ejemplo, anticuerpos y proteínas de fusión de Fc. Una proteína de fusión se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido que tiene una primera secuencia de aminoácidos que está unida a un polipéptido que tiene una segunda secuencia de aminoácidos que en la naturaleza no se uniría de forma natural. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender la secuencia de aminoácidos de al menos una porción de una región Fc (por ejemplo, una porción de una región Fc responsable de la unión al FcRn, una porción de una región Fc responsable de la unión al receptor Fcγ, o una porción de una región Fc responsable de la unión al complemento) y un polipéptido no inmunoglobulínico que contiene, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al ligando de un receptor o un dominio de unión al receptor de un ligando. Las secuencias de aminoácidos pueden estar presentes en proteínas separadas que se transportan juntas a una proteína de fusión, o en general pueden estar presentes en una sola proteína; sin embargo, están incluidas en un nuevo reordenamiento en un polipéptido de fusión. Las proteínas de fusión se pueden producir, por ejemplo, por síntesis química o por técnicas de recombinación genética para expresar un polinucleótido que codifica regiones peptídicas en una disposición deseada.

Los dominios respectivos de la presente descripción, tales como el dominio de unión al antígeno, el dominio de unión al FcRn que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido, y el dominio de unión al receptor Fcγ que tiene actividad de unión selectiva a un receptor Fcγ (dominio de unión a FcγR selectivo), se pueden unir entre sí mediante conectores o directamente por enlaces polipeptídicos. Los conectores comprenden conectores peptídicos arbitrarios que se pueden introducir por ingeniería genética, conectores sintéticos y conectores descritos en, por ejemplo, *Protein Engineering* (1996) 9 (3), 299-305. Sin embargo, se prefieren los enlaces peptídicos en la presente descripción. La longitud de los conectores peptídicos no está particularmente limitada, y los expertos en la técnica pueden seleccionarla adecuadamente según el propósito. La longitud es preferiblemente de cinco aminoácidos o más (sin limitación particular, el límite superior es generalmente de 30 aminoácidos o menos, preferiblemente de 20 aminoácidos o menos), y particularmente preferiblemente de 15 aminoácidos.

Por ejemplo, dichos conectores peptídicos incluyen preferiblemente:

Gly·Ser

Gly·Gly·Ser

Ser·Gly·Gly

5 Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 28)

Ser·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 29)

Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 30)

Ser·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 31)

Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 32)

10 Ser·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 33)

Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 34)

Ser·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 35)

(Gly·Gly·Gly·Gly·Ser (SEQ ID NO: 30))_n

(Ser·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO: 31))_n

15 donde n es un número entero 1 o mayor. La longitud de las secuencias de los conectores peptídicos la pueden seleccionar los expertos en la técnica en consecuencia dependiendo del propósito.

Se usan de forma rutinaria conectores sintéticos (agentes de reticulación químicos) para la reticulación de péptidos, y por ejemplo:

N-hidroxi-succinimida (NHS),

20 suberato de disuccinimidilo (DSS),

suberato de bis(sulfosuccinimidils) (BS3),

ditiobis(propionato de succinimidilo) (DSP),

ditiobis(propionato de sulfosuccinimidilo) (DTSSP),

etilenglicol-bis(succinato de succinimidilo) (EGS),

25 etilenglicol-bis(succinato de sulfosuccinimidilo) (sulfo-EGS),

tartrato de disuccinimidilo (DST), tartrato de disulfosuccinimidilo (sulfo-DST),

bis[2-(succinimidoxicarbonilo)etil]sulfona (BSOCOES),

y bis[2-(sulfosuccinimidoxicarbonilo)etil]sulfona (sulfo-BSOCOES). Estos agentes de reticulación están disponibles en el mercado.

30 Cuando se usan múltiples conectores para unir los respectivos dominios, pueden ser todos del mismo tipo o pueden ser de diferentes tipos.

Además de los conectores ilustrados antes, los conectores con marcadores peptídicos tales como el marcador His, marcador HA, marcador myc y marcador FLAG también se pueden usar de forma adecuada. Además, se pueden usar adecuadamente enlaces de hidrógeno, enlaces disulfuro, enlaces covalentes, interacción iónica y propiedades de unión entre sí como resultado de la combinación de los mismos. Por ejemplo, se puede usar la afinidad entre CH1 y CL del anticuerpo, y también se pueden usar regiones Fc que se originan de los anticuerpos biespecíficos descritos antes para la asociación de la región hetero Fc. Además, los enlaces disulfuro formados entre dominios también se pueden usar adecuadamente.

35 Con el fin de unir los dominios respectivos por enlace peptídico, los polinucleótidos que codifican los dominios se unen en el marco. Los métodos conocidos para unir polinucleótidos en el marco incluyen técnicas tales como la ligadura de fragmentos de restricción, PCR de fusión y PCR de solapamiento. Dichos métodos se pueden usar adecuadamente solos o en combinación para producir las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción. En la presente descripción, los términos "unido" y "fusionado", o "enlace" y "fusión" se usan indistintamente. Estos términos significan

que dos o más elementos o componentes tales como polipéptidos están unidos entre sí para formar una estructura única por cualquier medio, incluyendo los medios de enlace químico y las técnicas de recombinación descritos antes. Cuando dos o más dominios, elementos o componentes son polipéptidos, unir en un marco significa unir dos o más unidades de marcos de lectura para formar un marco de lectura continuo más largo a la vez que se mantienen los marcos de lectura correctos de los polipéptidos. Cuando se usan dos moléculas de Fab como un dominio de unión al antígeno, se puede usar un anticuerpo, que es una molécula de unión al antígeno de la presente descripción donde el dominio de unión al antígeno está unido en el marco por enlaces peptídicos sin un conector a un dominio de unión al FcRn que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido y el dominio de unión al receptor Fc γ que tiene actividad de unión selectiva a un receptor Fc γ (dominio de unión a Fc γ R selectivo), como una molécula de unión al antígeno preferida de la presente solicitud. A continuación se muestran ejemplos de múltiples realizaciones no limitantes de la molécula de unión al antígeno de la presente descripción que incluye la estructura de anticuerpos:

(1) un anticuerpo que comprende F(ab')₂ que comprende dos regiones variables y que tiene actividad de unión al antígeno que varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones y una región Fc que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido y actividad de unión selectiva a un receptor Fc γ ;

(2) un anticuerpo que comprende F(ab')₂ en donde una de las regiones variables que forman F(ab')₂ tiene actividad de unión al antígeno que varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones y la otra región variable tiene actividad de unión selectiva a un receptor Fc γ y una región Fc que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido; y

(3) un anticuerpo que comprende F(ab')₂ en donde una de las regiones variables que forman F(ab')₂ tiene actividad de unión al antígeno que varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones y la otra región variable tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido, y una región Fc que tiene actividad de unión selectiva a un receptor Fc γ .

Cuando un anticuerpo comprende la estructura mencionada antes de (3), se puede usar preferiblemente una región variable que tiene actividad de unión al FcRn que varía dependiendo de las condiciones de pH como la región variable que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido. Sin estar sujeto a una teoría particular, si se usa una región variable cuya actividad de unión al FcRn varía dependiendo de las condiciones de pH y si la región variable no tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH neutro, el anticuerpo se libera de FcRn a la superficie celular cuando el anticuerpo unido al FcRn en el endosoma ácido es transportado a la superficie celular y se puede recircular fácilmente al plasma.

Anticuerpos biespecíficos y métodos para producirlos.

Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos se pueden aplicar como una realización del método para preparar anticuerpos que comprenden las estructuras de (2) y (3) mencionadas antes. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que comprenden dos tipos de regiones variables que se unen específicamente a diferentes epítomos. Los anticuerpos biespecíficos de tipo IgG pueden ser secretados de un hibridoma híbrido (cuadroma) producido por fusión de dos tipos de hibridomas que producen anticuerpos IgG (Milstein et al., *Nature* (1983) 305, 537-540).

Cuando se produce un anticuerpo biespecífico usando técnicas de recombinación tales como las descritas en la sección sobre anticuerpos mencionada antes, se puede adoptar un método que introduce genes que codifican cadenas pesadas que contienen los dos tipos de regiones variables de interés en las células para coexpresarlas. Sin embargo, incluso cuando solo se considera la combinación de cadenas pesadas, dicho método de coexpresión producirá una mezcla de (i) una combinación de un par de cadenas pesadas en las que una de las cadenas pesadas contiene una región variable que se une a un primer epítomo y la otra cadena pesada contienen una región variable que se une a un segundo epítomo, (ii) una combinación de un par de cadenas pesadas que incluyen solo cadenas pesadas que contienen una región variable que se une al primer epítomo, y (iii) un combinación de un par de cadenas pesadas que incluyen solo cadenas pesadas que contienen una región variable que se une al segundo epítomo, que están presentes en una relación molecular de 2:1:1. Es difícil purificar moléculas de unión al antígeno que contienen la combinación deseada de cadenas pesadas a partir de la mezcla de tres tipos de combinaciones de cadenas pesadas.

Cuando se producen anticuerpos biespecíficos usando técnicas de recombinación tales como las descritas antes, los anticuerpos biespecíficos que comprenden la combinación heterogénea de cadenas pesadas se pueden secretar preferentemente alterando el dominio CH3 que constituye una cadena pesada usando sustituciones de aminoácidos adecuadas. Específicamente, es un método para mejorar la formación de cadenas pesadas heterogéneas e inhibir la formación de cadenas pesadas homogéneas por sustitución de la cadena lateral de aminoácidos en un dominio CH3 de cadena pesada por una cadena lateral más voluminosa (botón (*knob*) (que significa "proyección")) a la vez que se sustituye la cadena lateral de aminoácidos en el otro dominio CH3 de la cadena pesada por una cadena lateral más pequeña (ojal (*hole*) (que significa "hueco")) de modo que el "botón" se coloca en el "ojal" (documento WO 1996/027011, Ridgway et al. (*Protein Engineering* (1996) 9, 617-621), Merchant et al. (*Nat. Biotech.* (1998) 16, 677-681)).

Además, las técnicas conocidas para producir anticuerpos biespecíficos incluyen aquellas en las que se aplica un medio para regular la asociación de polipéptidos o asociación para formar multímeros heteroméricos constituidos por

polipéptidos a la asociación de cadenas pesadas. Específicamente, para producir anticuerpos biespecíficos, se pueden usar métodos para regular la asociación de cadenas pesadas alterando los restos de aminoácidos que forman la interfase entre las cadenas pesadas para formar así dos cadenas pesadas con diferentes secuencias, a la vez que se inhibe la asociación de cadenas pesadas que tienen una secuencia idéntica (WO 2006/106905). Dichos métodos se

5

En una realización no limitante de la presente descripción, dos polipéptidos que constituyen una región Fc derivada de un anticuerpo biespecífico descrito antes se pueden usar adecuadamente como la región Fc contenida en una molécula de unión al antígeno. Más específicamente, se pueden usar adecuadamente dos polipéptidos que constituyen una región Fc, en los que, de la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos, el aminoácido en la posición 349 como se indica por la numeración EU es Cys y el aminoácido en la posición 366 es Trp, y de la secuencia de aminoácidos del otro de los polipéptidos, el aminoácido en la posición 356 indicado por la numeración EU es Cys, el aminoácido en la posición 366 es Ser, el aminoácido en la posición 368 es Ala y el aminoácido en la posición 407 es Val.

10

En otra realización no limitante de la presente descripción, se pueden usar adecuadamente dos polipéptidos que constituyen una región Fc, en la que, de la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos, el aminoácido en la posición 409 según la numeración EU es Asp, y de la secuencia de aminoácidos del otro de los polipéptidos, el aminoácido en la posición 399 según la numeración EU es Lys, como la región Fc. En la realización anterior, el aminoácido en la posición 409 puede ser Glu en lugar de Asp, y el aminoácido en la posición 399 puede ser Arg en lugar de Lys. Adicionalmente, además del aminoácido Lys en la posición 399, se puede añadir adecuadamente Asp como aminoácido en la posición 360 o se puede añadir adecuadamente Asp como aminoácido en la posición 392.

15

20

En otra realización más no limitante de la presente descripción, se pueden usar adecuadamente dos polipéptidos que constituyen una región Fc, en la que, de la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos, el aminoácido en la posición 370 según la numeración EU es Glu, y de la secuencia de aminoácidos del otro de los polipéptidos, el aminoácido en la posición 357 según la numeración EU es Lys, como la región Fc.

25

En otra realización más no limitante de la presente descripción, se pueden usar adecuadamente dos polipéptidos que constituyen una región Fc, en la que, de la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos, el aminoácido en la posición 439 según la numeración EU es Glu, y de la secuencia de aminoácidos del otro de los polipéptidos, el aminoácido en la posición 356 según la numeración EU es Lys, como la región Fc.

30

En todavía otra realización más no limitante de la presente descripción, se puede usar adecuadamente cualquiera de las realizaciones indicadas a continuación, en la que se han combinado las anteriores, como la región Fc:

(i) dos polipéptidos que constituyen una región Fc, en la que, de la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos, el aminoácido en la posición 409 según la numeración EU es Asp y el aminoácido en la posición 370 es Glu, y de la secuencia de aminoácidos del otro de los polipéptidos, el aminoácido en la posición 399 según la numeración EU es Lys y el aminoácido en la posición 357 es Lys (en esta realización, el aminoácido en la posición 370 según la numeración EU puede ser Asp en lugar de Glu, y se puede usar el aminoácido Asp en la posición 392 según la numeración EU en lugar del aminoácido Glu en la posición 370 según la numeración EU);

35

(ii) dos polipéptidos que constituyen una región Fc, en la que, de la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos, el aminoácido en la posición 409 según la numeración EU es Asp y el aminoácido en la posición 439 es Glu, y de la secuencia de aminoácidos del otro de los polipéptidos, el aminoácido en la posición 399 según la numeración EU es Lys y el aminoácido en la posición 356 es Lys (en esta realización, se puede usar el aminoácido Asp en la posición 360 según la numeración EU, el aminoácido Asp en la posición 392 según la numeración EU, o el aminoácido Asp en la posición 439 según la numeración EU en lugar del aminoácido Glu en la posición 439 según la numeración EU);

40

(iii) dos polipéptidos que constituyen una región Fc, en la que, de la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos, el aminoácido en la posición 370 según la numeración EU es Glu y el aminoácido en la posición 439 es Glu, y de la secuencia de aminoácidos del otro de los polipéptidos, el aminoácido en la posición 357 según la numeración EU es Lys y el aminoácido en la posición 356 es Lys; y

45

dos polipéptidos que constituyen una región Fc, en la que, de la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos, el aminoácido en la posición 409 según la numeración EU es Asp, el aminoácido en la posición 370 es Glu, y el aminoácido en la posición 439 es Glu, y de la secuencia de aminoácidos del otro de los polipéptidos, el aminoácido en la posición 399 según la numeración EU es Lys, el aminoácido en la posición 357 es Lys, y el aminoácido en la posición 356 es Lys (en esta realización, el aminoácido en la posición 370 según la numeración EU puede no sustituirse por Glu, y además, cuando el aminoácido en la posición 370 no se sustituye por Glu, el aminoácido en la posición 439 puede ser Asp en lugar de Glu, o se puede usar el aminoácido Asp en la posición 392 en lugar del aminoácido Glu en la posición 439).

50

55

Además, en otra realización no limitante de la presente descripción, también se pueden usar adecuadamente dos polipéptidos que constituyen una región Fc, en la que, de la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos, el aminoácido en la posición 356 según la numeración EU es Lys, y de la secuencia de aminoácidos del otro de los

polipéptidos, el aminoácido en la posición 435 según la numeración EU es Arg y el aminoácido en la posición 439 es Glu.

En otra realización más no limitante de la presente descripción, también se pueden usar adecuadamente dos polipéptidos que constituyen una región Fc, en la que, de la secuencia de aminoácidos de uno de los polipéptidos, el aminoácido en la posición 356 según la numeración EU es Lys y el aminoácido en la posición 357 es Lys, y de la secuencia de aminoácidos del otro de los polipéptidos, el aminoácido en la posición 370 según la numeración EU es Glu, el aminoácido en la posición 435 es Arg, y el aminoácido en la posición 439 es Glu.

Adicionalmente, además de la técnica mencionada antes de asociar cadenas pesadas heterólogas, la tecnología CrossMab, que se conoce como una tecnología para asociar cadenas ligeras heterólogas, en la que una cadena ligera que forma una región variable que se une a un primer epítipo y una cadena ligera que forma una región variable que se une a un segundo epítipo se asocian respectivamente con una cadena pesada que forma una región variable que se une al primer epítipo y una cadena pesada que forma una región variable que se une al segundo epítipo (Scaefter et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2011) 108, 11187-11192)), también se puede usar para producir las moléculas de unión al antígeno proporcionadas por la presente descripción.

Mejora de la farmacocinética

En la presente descripción, la "capacidad de eliminar antígenos en plasma" se refiere a la capacidad de eliminar del plasma los antígenos que están presentes en el plasma cuando las moléculas de unión al antígeno se administran in vivo o cuando las moléculas de unión al antígeno se secretan in vivo. Por consiguiente, en la presente descripción, "la capacidad de las moléculas de unión al antígeno para eliminar antígenos en plasma aumenta" significa que cuando se administran las moléculas de unión al antígeno, la velocidad de eliminación del antígeno del plasma se acelera en comparación con cuando se administra una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno no varía dependiendo de las concentraciones de iones, una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al FcRn sin actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido, o una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al receptor Fcγ sin actividad de unión selectiva a un receptor Fcγ. Se puede determinar si la capacidad de una molécula de unión al antígeno para eliminar los antígenos en el plasma aumenta o no, por ejemplo, administrando antígenos solubles y la molécula de unión al antígeno in vivo, y después midiendo la concentración plasmática del antígeno soluble después de la administración. Cuando la concentración de los antígenos solubles en el plasma disminuye después de la administración de los antígenos solubles y las moléculas de unión al antígeno que comprenden un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones, el dominio de unión al FcRn tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido, y un dominio de unión al receptor Fcγ que tiene actividad de unión selectiva a un receptor Fcγ (un dominio de unión a FcγR selectivo), la capacidad de las moléculas de unión al antígeno para eliminar antígenos en el plasma se considera que ha aumentado. El antígeno soluble puede ser un antígeno que está unido a una molécula de unión al antígeno o un antígeno que no está unido a una molécula de unión al antígeno en el plasma, y su concentración se puede determinar como una "concentración plasmática del antígeno unido a la molécula de unión al antígeno" o como una "concentración plasmática del antígeno no unido por la molécula de unión al antígeno", respectivamente (esta última es sinónima de "concentración de antígeno libre en plasma"). La "concentración de antígeno total en el plasma" significa la suma de las concentraciones del antígeno unido a la molécula de unión al antígeno y el antígeno no unido por una molécula de unión al antígeno, o la "concentración de antígeno libre en plasma", que es la concentración del antígeno no unido por una molécula de unión al antígeno. Por lo tanto, la concentración de antígeno soluble se puede determinar como la "concentración de antígeno total en plasma". Varios métodos para medir la "concentración de antígeno total en plasma" o la "concentración de antígeno libre en plasma" son bien conocidos en la técnica como se describe más adelante.

En la presente descripción, "potenciación de la farmacocinética", "mejora de la farmacocinética" y "farmacocinética superior" se pueden decir de otro modo como "potenciación de la retención en el plasma (sangre)", "mejora de la retención en el plasma (sangre)", "retención en el plasma (sangre) superior" y "retención prolongada en el plasma (sangre)". Estos términos son sinónimos.

En la presente descripción, "mejora de la farmacocinética" significa no solo la prolongación del periodo hasta la eliminación del plasma (por ejemplo, hasta que la molécula de unión al antígeno se degrada intracelularmente o similar y no puede volver al plasma) después de la administración de la molécula de unión al antígeno a seres humanos, o animales no humanos tales como ratones, ratas, monos, conejos y perros, sino también la prolongación de la retención en el plasma de la molécula de unión al antígeno en una forma que permite la unión al antígeno (por ejemplo, en una forma de la molécula de unión al antígeno sin el antígeno) durante el periodo de administración hasta la eliminación debida a la degradación. La IgG humana que tiene una región Fc natural se puede unir al FcRn de animales no humanos. Por ejemplo, se puede usar preferiblemente el ratón para la administración con el fin de confirmar la propiedad de la molécula de unión al antígeno de la descripción, puesto que la IgG humana que tiene una región Fc natural se puede unir al FcRn de ratón más fuerte que al FcRn humano (*Int Immunol.* (2001) 13(12): 1551-1559). Como otro ejemplo, también se puede usar preferiblemente el ratón en el que sus genes naturales de FcRn se alteran y se aloja un transgén para el gen de FcRn humano para que sea expresado (*Methods Mol Biol.* 2010; 602: 93-104) para ser administrado con el fin de confirmar la propiedad de la molécula de unión al antígeno de la descripción descrita en lo sucesivo. Específicamente, la "mejora de la farmacocinética" también incluye la prolongación del periodo hasta la eliminación debido a la degradación de la molécula de unión al antígeno no unida a los antígenos (la forma de la

molécula de unión al antígeno sin el antígeno). La molécula de unión al antígeno en plasma no se puede unir a un nuevo antígeno si la molécula de unión al antígeno ya se ha unido a un antígeno. Por lo tanto, cuanto más largo es el periodo en que la molécula de unión al antígeno no se une a un antígeno, más largo es el periodo en que se puede unir a un nuevo antígeno (mayor es la posibilidad de unirse a otro antígeno). Esto permite la reducción del periodo de tiempo en que un antígeno está libre de la molécula de unión al antígeno in vivo y la prolongación del periodo en que un antígeno está unido a la molécula de unión al antígeno. La concentración plasmática de la forma de la molécula de unión al antígeno sin el antígeno se puede aumentar y el periodo en que el antígeno se une a la molécula de unión al antígeno se puede prolongar acelerando la eliminación del antígeno del plasma mediante la administración de la molécula de unión al antígeno. Específicamente, la "mejora de la farmacocinética de la molécula de unión al antígeno" en la presente descripción incluye la mejora de un parámetro farmacocinético de la forma de la molécula de unión al antígeno sin el antígeno (cualquiera de prolongación de la semivida en el plasma, prolongación del tiempo medio de retención en el plasma y deterioro del aclaramiento plasmático), la prolongación del periodo en que el antígeno se une a la molécula de unión al antígeno después de la administración de la molécula de unión al antígeno, y la aceleración de la eliminación del antígeno mediada por la molécula de unión al antígeno del plasma. La mejora de la farmacocinética de la molécula de unión al antígeno se puede evaluar determinando cualquiera de los parámetros, semivida en el plasma, tiempo medio de retención en el plasma y aclaramiento plasmático de la molécula de unión al antígeno o la forma sin el antígeno de la misma ("Pharmacokinetics: Enshu-niyoru Rikai (Understanding through practice)" Nanzando). Por ejemplo, la concentración plasmática de la molécula de unión al antígeno o su forma sin el antígeno se determina después de la administración de la molécula de unión al antígeno a ratones, ratas, monos, conejos, perros o seres humanos. Después, se determina cada parámetro. Cuando la semivida plasmática o el tiempo medio de retención en el plasma se prolonga, se puede considerar que la farmacocinética de la molécula de unión al antígeno mejora. Los parámetros se pueden determinar por métodos conocidos por los expertos en la materia. Los parámetros se pueden evaluar de manera adecuada, por ejemplo, mediante análisis no compartimental usando el software de análisis farmacocinético WinNonlin (Pharsight) de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto. La concentración plasmática de la molécula de unión al antígeno sin el antígeno se puede determinar por métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, usando el método de ensayo descrito en Clin. Pharmacol. 2008 Abr; 48 (4): 406-417.

En la presente descripción, la "mejora de la farmacocinética" también incluye la prolongación del periodo en que un antígeno se une a una molécula de unión al antígeno después de la administración de la molécula de unión al antígeno. Se puede evaluar si el periodo en que un antígeno se une a la molécula de unión al antígeno después de la administración de la molécula de unión al antígeno se prolonga, determinando la concentración plasmática de antígeno libre. La prolongación se puede considerar basándose en la concentración plasmática determinada de antígeno libre o el periodo de tiempo requerido para un aumento en la relación de la concentración de antígeno libre a la concentración del antígeno total.

La concentración plasmática de antígeno libre no unido a la molécula de unión al antígeno o la relación de concentración de antígeno libre a la concentración total se puede determinar por métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, por el método usado en *Pharm Res.* 2006 Ene; 23 (1): 95-103. Alternativamente, cuando un antígeno presenta una función particular in vivo, se puede evaluar si el antígeno está unido a una molécula de unión al antígeno que neutraliza la función del antígeno (molécula antagonista) ensayando si la función del antígeno está neutralizada. Se puede evaluar si la función del antígeno está neutralizada analizando un marcador de vivo que refleje la función del antígeno. Se puede evaluar si el antígeno está unido a una molécula de unión al antígeno que activa la función del antígeno (molécula agonista) analizando un marcador in vivo que refleje la función del antígeno.

La determinación de la concentración plasmática de antígeno libre y la relación de la cantidad de antígeno libre en plasma a la cantidad de antígeno total en plasma, el ensayo de marcadores in vivo, y mediciones similares no están particularmente limitadas; sin embargo, los ensayos se llevan a cabo preferiblemente después de un cierto periodo de tiempo después de la administración de la molécula de unión al antígeno. En la presente descripción, el periodo después de la administración de la molécula de unión al antígeno no está particularmente limitado; los expertos en la técnica pueden determinar el periodo adecuado dependiendo de las propiedades y similares de la molécula de unión al antígeno administrada. Dichos periodos incluyen, por ejemplo, un día después de la administración de la molécula de unión al antígeno, tres días después de la administración de la molécula de unión al antígeno, siete días después de la administración de la molécula de unión al antígeno, 14 días después de la administración de la molécula de unión al antígeno y 28 días después de la administración de la molécula de unión al antígeno. En la presente descripción, el concepto "concentración de antígeno en el plasma" comprende tanto "concentración de antígeno total en el plasma" que es la suma del antígeno unido a la molécula de unión al antígeno como la concentración de antígeno no unido o "concentración de antígeno libre en el plasma" que es concentración de antígeno no unido a la molécula de unión al antígeno.

La concentración total de antígeno en el plasma se puede reducir por administración, como molécula de unión al antígeno, de la molécula de unión al antígeno de la presente descripción en 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces, 1 000 veces o incluso más en comparación con la administración de una molécula de unión al antígeno que contiene un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno es independiente de la concentración de iones o una molécula de unión al antígeno que contiene una región Fc con una actividad de unión a FcγR deteriorada, o en comparación con cuando no se administra la molécula con el dominio de unión al antígeno de la presente descripción.

La relación de antígeno molar/molécula de unión al antígeno se puede calcular como se muestra a continuación:

valor A: concentración molar de antígeno en cada tiempo de medición

valor B: concentración molar de molécula de unión al antígeno en cada tiempo de medición

valor C: concentración molar de antígeno por concentración molar de molécula de unión al antígeno (relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno) en cada tiempo de medición

$$C = A/B.$$

Un valor C más pequeño indica una mayor eficiencia de eliminación del antígeno por molécula de unión al antígeno, mientras que un valor C más alto indica una menor eficiencia de eliminación del antígeno por molécula de unión al antígeno.

10 La relación molar de antígeno /molécula de unión al antígeno se puede calcular como se ha descrito antes.

Una reducción de 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, 200 veces, 500 veces, 1 000 veces o una reducción incluso mayor de la relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno se puede lograr por la administración de una molécula de unión al antígeno de la presente descripción en comparación con cuando se administra una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno no varía dependiendo de las concentraciones de iones, una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión a FcRn sin actividad de unión a FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido, o una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al receptor Fcγ sin actividad de unión selectiva a un receptor Fcγ, como la molécula de unión al antígeno.

20 En la presente descripción, se usa una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno no varía dependiendo de las concentraciones de iones, una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión a FcRn sin actividad de unión a FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido, o una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al receptor Fcγ sin actividad de unión selectiva a un receptor Fcγ como una molécula de unión al antígeno de referencia para compararla con las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción.

25 Cuando se evalúa el efecto de un dominio de unión al FcRn que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido, la reducción de la concentración de antígeno total en plasma o la relación molar de antígeno/anticuerpo se puede evaluar mediante el modelo de coinyección de antígeno y anticuerpo o bien el modelo de infusión de antígeno en estado estacionario usando línea 32 o línea 276 de ratón transgénico con FcRn humano (Jackson Laboratories, *Methods Mol. Biol.* (2010) 602, 93-104), cuando la molécula de unión al antígeno no reacciona de forma cruzada con el antígeno homólogo de ratón. Cuando una molécula de unión al antígeno reacciona de forma cruzada con su homólogo de ratón, se puede evaluar simplemente inyectando una molécula de unión al antígeno a la línea 32 o 276 de ratón transgénico con FcRn humano (Jackson Laboratories). En el modelo de coinyección, se administra una mezcla de molécula de unión al antígeno y antígeno al ratón. En el modelo de infusión de antígeno en estado estacionario, se implanta una bomba de infusión que contiene una solución de antígeno en el ratón para lograr una concentración constante de antígeno en el plasma, y después se inyecta la molécula de unión al antígeno al ratón. La molécula de unión al antígeno de ensayo se administra en la misma dosis. La concentración de antígeno total en el plasma, la concentración de antígeno libre en el plasma y la concentración de molécula de unión al antígeno en el plasma se miden en el tiempo de medición adecuado usando un método conocido por los expertos en la técnica.

40 Para evaluar los efectos de un dominio de unión al receptor Fcγ que tiene actividad de unión selectiva a los receptores Fcγ, cuando una molécula de unión al antígeno no reacciona de forma cruzada con un antígeno homólogo de ratón, la concentración total de antígeno en plasma o la disminución de la relación molar de antígeno/anticuerpo se pueden evaluar por el modelo de inyección simultánea de antígeno-anticuerpo o el modelo de inyección de antígeno en estado estacionario usando los ratones C57BL/6J usados de forma convencional (Charles River, Japón). Cuando una molécula de unión al antígeno reacciona de forma cruzada con el homólogo de ratón, la molécula de unión al antígeno puede simplemente inyectarse en ratones C57BL/6J usados de forma convencional (Charles River, Japón) para llevar a cabo la evaluación.

50 En el modelo de coinyección, se administra una mezcla de la molécula de unión al antígeno y el antígeno a los ratones. En el modelo de infusión de antígeno en estado estacionario, se inserta en ratones una bomba de infusión cargada con una solución de antígeno para lograr una concentración constante de antígeno en el plasma, y después se inyecta en los ratones la molécula de unión al antígeno. Las moléculas de unión al antígeno de ensayo se administran en la misma dosis. La concentración de antígeno total en el plasma, la concentración de antígeno libre en el plasma y la concentración de la molécula de unión al antígeno en el plasma se miden en tiempos de medición adecuados usando métodos conocidos por los expertos en la técnica.

55 La concentración de antígeno total o libre en el plasma y la relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno se puede medir a los 2, 4, 7, 14, 28, 56 u 84 días después de la administración para evaluar el efecto a largo plazo de la presente descripción. En otras palabras, se determina una concentración de antígeno en el plasma a largo plazo

mediendo la concentración de antígeno total o libre en el plasma y la relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno a los 2, 4, 7, 14, 28, 56 u 84 días después de la administración de una molécula de unión al antígeno con el fin de evaluar la propiedad de la molécula de unión al antígeno de la presente descripción. Se puede determinar si la molécula de unión al antígeno descrita en la presente descripción logra la reducción de la concentración de antígeno plasmático o la relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno mediante la evaluación de la reducción en uno cualquiera o más de los tiempos de medición descritos antes.

La concentración de antígeno total o libre en el plasma y la relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno se puede medir a los 15 minutos, 1, 2, 4, 8, 12 o 24 horas después de la administración para evaluar el efecto a corto plazo de la presente descripción. En otras palabras, se determina una concentración de antígeno en el plasma a corto plazo midiendo la concentración de antígeno total o libre en el plasma y la relación molar de antígeno/molécula de unión al antígeno a los 15 minutos, 1, 2, 4, 8, 12 o 24 horas después de la administración de una molécula de unión al antígeno con el fin de evaluar la propiedad de la molécula de unión al antígeno de la presente descripción.

La ruta de administración de una molécula de unión al antígeno de la presente descripción se puede seleccionar de inyección intradérmica, intravenosa, intravítrea, subcutánea, intraperitoneal, parenteral e intramuscular.

En la presente descripción, se prefiere la mejora de la farmacocinética de la molécula de unión al antígeno en seres humanos. Cuando la retención en el plasma en seres humanos es difícil de determinar, se puede predecir basándose en la retención en el plasma en ratones (por ejemplo, ratones normales, ratones transgénicos que expresan antígeno humano, ratones transgénicos que expresan FcRn humano) o monos (por ejemplo, macaco cangrejero)

"La mejora de la farmacocinética y la retención plasmática prolongada de una molécula de unión al antígeno" en la presente descripción significa la mejora de cualquier parámetro farmacocinético (cualquiera de prolongación de la semivida en el plasma, prolongación del tiempo medio de retención en el plasma, reducción de aclaramiento plasmático y biodisponibilidad) después de la administración in vivo de la molécula de unión al antígeno, o un aumento en la concentración de la molécula de unión al antígeno en el plasma en un tiempo adecuado después de la administración. Se puede determinar midiendo cualquier parámetro tal como la semivida en plasma, el tiempo medio de retención en plasma, el aclaramiento plasmático y la biodisponibilidad de la molécula de unión al antígeno (Pharmacokinetics: Enshu-niyoru Rikai (Understanding through practice), (Nanzando)). Por ejemplo, cuando se administra una molécula de unión al antígeno a ratones (ratones normales y ratones transgénicos con FcRn humano), ratas, monos, conejos, perros, seres humanos, etc., y se determina la concentración de la molécula de unión al antígeno en el plasma y se calcula cada uno de los parámetros, se puede considerar que la farmacocinética de la molécula de unión al antígeno mejora cuando la semivida en el plasma o el tiempo de retención medio en el plasma se prolonga. Estos parámetros se pueden determinar por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los parámetros se pueden evaluar adecuadamente por análisis no compartimentales usando el software de análisis farmacocinético WinNonlin (Pharsight) de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto.

Se han identificado cuatro tipos de FcγR, FcγRI, FcγRIIb, FcγRIII y FcγRIV en ratones. También en seres humanos, se han identificado como los FcγR correspondientes, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, FcγRIIIb y FcγRIIIc. FcγRIIb, que se considera el único tipo inhibidor entre estos FcγR, se conserva tanto en seres humanos como en ratones. Los otros FcγR, excepto FcγRIIIb, transmiten señales de activación a través del motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora (ITAM), mientras que FcγRIIb transmite señales inhibitorias a través del motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM) presente dentro de las células (*Nat. Rev. Immunol.* (2008) 8, 34-47).

Se ha informado que FcγRIIb1 y FcγRIIb2 son variantes de empalme de FcγRIIb. Tanto en seres humanos como en ratones, FcγRIIb1 tiene un dominio intracelular más largo que FcγRIIb2. Se ha confirmado que FcγRIIb1 se expresa en células B, y se ha confirmado que FcγRIIb2 se expresa en macrófagos, mastocitos, células dendríticas, basófilos, neutrófilos y eosinófilos (*J. Clin. Immunol.* (2005) 25 (1), 1-18).

Hasta ahora, en seres humanos, se ha descrito que la disfunción y la disminución de la expresión de FcγRIIb estaban correlacionadas con la aparición de enfermedades autoinmunitarias. Por ejemplo, se ha descrito que en algunos pacientes con SLE, la unión de los activadores transcripcionales se atenúa debido al polimorfismo en una región promotora de la expresión de FcγRIIb, que da como resultado una disminución de la expresión de FcγRIIb (*Hum. Genet.* (2005) 117, 220-227; *J. Immunol.* (2004) 172, 7192-7199; y *J. Immunol.* (2004) 172, 7186-7191). Además, entre los pacientes con SLE, se han descrito dos tipos de alotipos, donde el aminoácido en la posición 233 es Ile o Thr en FcγRIIb. Esta posición existe en la región transmembrana de FcγRIIb, y se ha descrito que es menos probable que exista FcγRIIb en la balsa lipídica cuando el aminoácido en la posición 233 es Thr en comparación con cuando este aminoácido es Ile, y como resultado, la función de transducción de señales de FcγRIIb disminuye (*Nat. Med.* (2005) 11, 1056-1058; *Hum. Mol. Genet.*, (2005) 14, 2881-2892). También se ha descrito en ratones, que los ratones con inactivación génica producidos por alteración del gen de FcγRIIb en ratones C57BL/6 presentan síntomas similares a SLE tales como la producción de autoanticuerpos y glomerulonefritis (*Immunity* 13 (2000) 277-285; *J. Exp. Med.* (2002) 195, 1167-1174). Además, hasta ahora, se ha descrito un nivel de expresión reducido de FcγRIIb y similares en ratones considerados como modelos con inicio natural de SLE (*Immunogenetics* (2000) 51, 429-435; *Int. Immunol.* (1999) 11, 1685-1691; *Curr. Biol.* (2000) 10, 227-230; *J. Immunol.* (2002) 169, 4340-4346). A partir de estos informes, se considera que FcγRIIb regula la inmunidad humoral en ratones como en seres humanos.

Cuando un anticuerpo que lleva un Fc de la presente descripción elimina los antígenos a través de FcγRIIb, se considera que la función de endocitosis de FcγRIIb es la contribución más importante entre las funciones de FcγRIIb. Como se ha descrito antes, FcγRIIb1 y FcγRIIb2 existen como variantes de empalme de FcγRIIb, pero se describe que este último está implicado principalmente en la endocitosis de un complejo inmunitario de un anticuerpo y antígeno (5 *J. Immunol.* (1994), 152 574-585; *Science* (1992) 256, 1808-1812; *Cell* (1989) 58, 317-327). Hasta ahora, se ha descrito que FcγRIIb2 de ratón se incorpora en un hoyo recubierto de clatrina y es endocitado (*Cell* (1989) 58, 317-327). Además, se ha descrito que es necesario un motivo de dileucina para la endocitosis mediada por FcγRIIb2, y el motivo de dileucina se conserva tanto en seres humanos como en ratones (*EMBO J.* (1994) 13 (13), 2963-2969). De estos, FcγRIIb2 puede tener una capacidad endocitótica en seres humanos como en ratones.

Por otro lado, a diferencia de FcγRIIb2, se ha descrito que FcγRIIb1 no causa endocitosis. FcγRIIb1 tiene una secuencia insertada en su dominio intracelular que no se encuentra en FcγRIIb2. Se considera que esta secuencia inhibe la absorción de FcγRIIb1 en un hoyo recubierto de clatrina y, como resultado, se inhibe la endocitosis (*J. Cell. Biol.* (1992) 116, 875-888; *J. Cell. Biol.* (1989) 109, 3291-3302). También en seres humanos, FcγRIIb1 tiene una secuencia de inserción en un sitio similar al de FcγRIIb2 como en ratones; por lo tanto, se supone que la diferencia en la capacidad endocitótica entre FcγRIIb1 y FcγRIIb2 es causada por un mecanismo similar. Además, tanto en seres humanos como en ratones, se ha descrito que aproximadamente 40% de los complejos inmunitarios en la superficie celular se incorporan a la célula en 20 minutos (*Mol. Immunol.* (2011) 49, 329-337; *Science* (1992) 256, 1808-1812). Por lo tanto, también en seres humanos, se supone que FcγRIIb2 absorbe complejos inmunitarios en las células en tasas similares a las de los ratones.

Puesto que FcγRIIb es el único que tiene ITIM dentro de la célula tanto en seres humanos como en ratones entre la familia de FcγR y la distribución de las células que expresan es la misma, se supone que su función en el control inmunitario es similar. Además, considerando el hecho de que los complejos inmunitarios son absorbidos en células a tasas similares en seres humanos y ratones, los efectos de eliminación de antígeno de los anticuerpos mediados por FcγRIIb en seres humanos pueden ser predecibles usando ratones. Las moléculas de unión al antígeno mF44 y mF46 (25 tienen propiedades de unión a antígenos solubles de una manera dependiente del pH, y tienen afinidad mejorada por FcγRIIb y FcγRIII de ratón en comparación con mIgG1, que es una molécula de unión al antígeno que tiene la propiedad de unirse a un antígeno soluble en una manera dependiente del pH. De hecho, se muestra en el Ejemplo 5 que el aclaramiento de antígeno aumentaba cuando se administraba mF44 o mF46 a ratones normales en comparación con cuando se administró mIgG1.

Además, en el Ejemplo 6 descrito más adelante, se llevó a cabo un experimento similar usando ratones deficientes en la cadena γ y del receptor Fc. Se ha descrito que los FcγR distintos de FcγRIIb se expresan solo en presencia simultánea de una cadena gamma en ratones. Por lo tanto, solo FcγRIIb se expresa en los ratones deficientes en la cadena γ y del receptor Fc. La administración de mF44 o mF46, que son moléculas de unión al antígeno que tienen la propiedad de unirse a antígenos solubles en una manera dependiente del pH, a ratones deficientes en la cadena γ y del receptor Fc (30 permite la evaluación de los efectos de aceleración de eliminación de antígeno cuando la unión a FcγRIIb mejora selectivamente. A partir de los resultados del Ejemplo 6, cuando se administraba mF44 o mF46 (que son moléculas de unión al antígeno que tienen la propiedad de unirse a antígenos solubles de una manera dependiente del pH) a ratones deficientes en cadena γ y del receptor Fc, se mostró que el aclaramiento de antígeno aumentaba en comparación con cuando se administraba mIgG1 (que es una molécula de unión al antígeno que tiene la propiedad de unirse a antígenos solubles de una manera dependiente del pH) a los ratones. Además, los resultados del Ejemplo 6 muestran que cuando se administra a ratones deficientes en la cadena γ y del receptor Fc, mF44 o mF46 causan grados similares de eliminación de antígeno a cuando se administran a ratones normales.

En el Ejemplo 6, se realizó un experimento similar usando ratones deficientes en FcγRIII. Puesto que mIgG1, mF44 y mF46 se unen solo a FcγRIIb y FcγRIII entre los mFcγR, la administración de los anticuerpos a ratones deficientes en FcγRIII permite la evaluación de los efectos de aceleración de la eliminación de antígeno cuando la unión de FcγRIIb se mejora selectivamente. Los resultados del Ejemplo 6 indican que cuando se administraba mF44 o mF46 a ratones deficientes en FcγRIII, el aclaramiento de antígeno aumentaba en comparación con cuando se administraba mIgG1 al aclaramiento de antígeno de ratones. Además, los resultados del Ejemplo 6 mostraban que cuando se administran a ratones deficientes en FcγRIII, mF44 y mF46 causan grados similares de eliminación de antígeno a cuando se administran a ratones deficientes en la cadena γ y del receptor Fc y cuando se administran a ratones normales.

Estos resultados ponían de manifiesto que la eliminación del antígeno se puede acelerar mejorando la unión selectiva a FcγRIIb solo sin mejorar la unión a los FcγR activos.

Además de los documentos dados discutidos hasta ahora, basándose en los resultados de evaluación mencionados antes usando ratones, se considera que la absorción de complejos inmunitarios en las células a través de FcγRIIb (55 tiene lugar in vivo en seres humanos como en ratones, y como resultado, los anticuerpos que tienen Fc con unión selectivamente mejorada al FcγRIIb humano puede acelerar la eliminación de sus antígenos. Además, como se ha discutido antes, puesto que se considera que la absorción de complejos inmunitarios en las células a través de FcγRIIb tiene lugar en tasas similares en ratones y seres humanos, los efectos de acelerar la eliminación de antígenos comparables a los de los anticuerpos que tienen Fc con afinidad mejorada para FcγRIIb de ratón se pueden lograr in vivo en seres humanos usando Fc en el que la afinidad con el FcγRIIb humano se potencia en un grado similar.

Como se describe en el documento WO 2009/125825, Fv4-IgG1 es un anticuerpo que resulta de conferir a un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado H54/L28-IgG1 la actividad para unirse al antígeno de una manera dependiente del pH, es decir, alterando la región variable para conferir la propiedad de unirse a un antígeno a pH 7.4 y disociarse del antígeno a pH 5.8. El documento WO 2009/125825 mostró que la eliminación del receptor de IL-6 humano soluble se acelera enormemente en ratones a los que se administra conjuntamente Fv4 IgG1 y receptor de IL-6 humano soluble como el antígeno en comparación con ratones a los que se administra conjuntamente H54/L28-IgG1 y el antígeno. En la presente memoria, la cadena pesada H54-IgG1 y la cadena ligera L28-CK incluidas en H54/L28-IgG1 se muestran en la SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 37, respectivamente; y VH3-IgG1 de cadena pesada y VL3-CK de cadena ligera incluidos en Fv4-IgG1 se muestran en la SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 39, respectivamente.

El receptor de IL-6 humano soluble unido a un anticuerpo H54/L28-IgG1, que se une al receptor de IL-6 humano soluble, se recircula al plasma junto con el anticuerpo a través de FcRn. Por otro lado, el anticuerpo Fv4-IgG1 que se une al receptor de IL-6 humano soluble de una manera dependiente del pH se disocia del receptor de IL-6 humano soluble que se ha unido al anticuerpo en unas condiciones ácidas en el endosoma. Puesto que el receptor de IL-6 humano soluble disociado se degrada en el lisosoma, la eliminación del receptor de IL-6 humano soluble se puede acelerar mucho, y el anticuerpo Fv4-IgG1 que se une al receptor de IL-6 humano soluble en una manera dependiente del pH se recircula al plasma después de unirse al FcRn en el endosoma. Puesto que el anticuerpo recirculado se puede unir a un receptor de IL-6 humano soluble de nuevo, se repite la unión al antígeno (receptor de IL-6 humano soluble) y la recirculación al plasma a través de FcRn. Como resultado, una sola molécula de anticuerpo se puede unir repetidamente al receptor de IL-6 humano soluble múltiples veces (Fig. 1).

Por otro lado, como se describe en la presente descripción, se ha encontrado que la concentración plasmática del antígeno soluble se puede reducir en gran medida por administración de una molécula de unión al antígeno con actividad de unión a FcγR mejorada del dominio de unión al receptor Fcγ incluido en el molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno en el que la actividad de unión al antígeno cambia dependiendo de las condiciones de concentración de iones tales como pH, un dominio de unión al FcRn que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido y un dominio de unión al receptor Fcγ.

Aunque sin estar limitados a una teoría particular, la disminución inesperada de la concentración de antígeno soluble en el plasma observada por administración de una molécula de unión al antígeno con una unión mejorada a FcγR, que comprende un dominio de unión al antígeno en el que la actividad de unión al antígeno cambia dependiendo de las condiciones de concentración de iones tales como pH y un dominio de unión al FcRn que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido, se puede explicar como sigue.

Como se ha descrito antes, una molécula de unión al antígeno tal como Fv4-IgG1 que comprende un dominio de unión al antígeno en el que la actividad de unión al antígeno cambia dependiendo de las condiciones de concentración de iones puede ser capaz de unirse repetidamente al antígeno múltiples veces, pero el efecto de la disociación del antígeno soluble en el endosoma para acelerar la eliminación del antígeno del plasma puede depender de la velocidad de absorción del complejo del antígeno y la molécula de unión al antígeno en el endosoma. Las moléculas de unión al antígeno con actividades de unión mejoradas a diversos FcγR, que comprenden un dominio de unión al antígeno en el que la actividad de unión al antígeno cambia dependiendo de las condiciones de concentración de iones, son absorbidas activamente en las células por unión a varios FcγR expresados en la membrana celular, y puede circular de nuevo en el plasma por recirculación por la unión entre FcRn y el dominio de unión al FcRn en la molécula que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido. Más específicamente, puesto que las moléculas de unión al antígeno mencionadas antes que formaban complejos con antígenos solubles en el plasma se absorben activamente en las células a través de los FcγR expresados en la membrana celular, el efecto de acelerar la eliminación de antígenos solubles en el plasma puede ser más pronunciado que el de moléculas de unión al antígeno cuyas actividades de unión a diversos FcγR no mejoran.

Las actividades de unión a FcγR de anticuerpos que se unen a antígenos de membrana tienen una función importante en la actividad citotóxica de los anticuerpos. Por lo tanto, cuando la actividad citotóxica es necesaria para que un anticuerpo se use como un producto farmacéutico, se usa un isotipo IgG1 humano que tiene una alta actividad de unión a FcγR, y se usa ampliamente la técnica de potenciar las actividades de unión a FcγR del anticuerpo para mejorar la actividad citotóxica del anticuerpo. Por otro lado, no se conocía la función de las actividades de unión a FcγR de los anticuerpos que se unen a antígenos solubles y se usan como productos farmacéuticos, y las diferencias en los efectos fisiológicos en los organismos a los que se administra IgG1 humana con altas actividades de unión a FcγR e IgG2 humana e IgG4 humana con bajas actividades de unión a FcγR, debido a sus diferencias en las actividades de unión a FcγR, no se había examinado completamente hasta ahora. Como se describe más adelante en los Ejemplos, en realidad se confirmó que en el plasma de individuos a los que se administró anticuerpos cuyas actividades de unión a FcγR se habían perdido, no se afectaba a cambios en la concentración de antígeno soluble. Por otro lado, en la presente descripción, se encontró que la concentración de antígenos solubles en el plasma se reducía considerablemente en individuos a los que se administraron moléculas de unión al antígeno con actividades de unión a FcγR mejoradas y que comprenden un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión a antígenos solubles cambian según las condiciones de concentración de iones. Más específicamente, combinando un dominio de unión al FcRn que tiene una actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido y un dominio de unión al antígeno cuya unión a antígenos solubles cambia dependiendo de las condiciones de concentración de iones, que son dominios incluidos en moléculas de unión al antígeno que se dirigen a antígenos solubles, se encontró por

primera vez una ventaja de mejorar la unión a FcγR.

Método ex vivo de eliminación de antígenos del plasma

Un ejemplo de una realización no limitante del uso de una molécula de unión al antígeno para el método de eliminación de antígenos del plasma, que proporciona la presente descripción, incluye el uso de la molécula de unión al antígeno para un llamado método ex vivo de eliminación de los antígenos del plasma, que comprende poner en contacto la molécula de unión al antígeno de la presente descripción con plasma aislado de sujetos para permitir la formación de complejos inmunitarios, y permitir que los complejos inmunitarios se pongan en contacto con células que expresan receptores Fcγ y FcRn. La velocidad de eliminación de antígenos del plasma también se puede promover por sustitución/combinación de un método para administrar moléculas de unión al antígeno in vivo con un llamado método ex vivo, en el que el plasma que contiene moléculas de unión al antígeno y antígenos que se unen a las moléculas de unión al antígeno se extrae temporalmente del cuerpo y después se pone en contacto con las células que expresan FcRn y receptores Fcγ durante un cierto periodo de tiempo, y el plasma que contiene moléculas de unión al antígeno recirculadas de forma extracelular (o re-secretadas o recirculadas) que no están unidas al antígeno se devuelve al cuerpo.

Además, un ejemplo de una realización no limitante del uso de una molécula de unión al antígeno en el método proporcionado por la presente descripción para eliminar antígenos del plasma incluye el uso de la molécula de unión al antígeno en un llamado método ex vivo para eliminar antígenos del plasma, que incluye poner en contacto un complejo inmunitario presente en el plasma aislado de un sujeto al que se administran las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción con células que expresan receptores Fcγ y FcRn.

Se puede confirmar si el antígeno se elimina o no del plasma, por ejemplo, evaluando si la tasa de eliminación de antígeno en el plasma se acelera o no en comparación con cuando se usa una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno no varía dependiendo de las concentraciones de iones, una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al FcRn sin actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido, o una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al receptor Fcγ sin actividad de unión selectiva a un receptor Fcγ como control en lugar de una molécula de unión al antígeno de la presente descripción.

Métodos para producir moléculas de unión al antígeno.

La presente descripción proporciona un método para producir una molécula de unión al antígeno que tiene la función de eliminar antígenos en el plasma, en donde el método comprende las siguientes etapas de (a) a (e):

(a) obtener un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones;

(b) obtener un gen que codifica el dominio de unión al antígeno seleccionado en la etapa (a);

(c) unir operativamente el gen obtenido en la etapa (b) con un gen que codifica un dominio de unión al FcRn que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido y un dominio de unión al receptor Fcγ que tiene actividad de unión selectiva a un receptor Fcγ;

(d) cultivar células hospedantes que contienen el gen operativamente unido en la etapa (c); y

(e) aislar una molécula de unión al antígeno de la solución de cultivo obtenida en la etapa (d).

En una realización no limitante de la presente descripción, después de aislar un polinucleótido que codifica un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión cambia dependiendo de las condiciones seleccionadas como se ha descrito antes, el polinucleótido se inserta en un vector de expresión adecuado. Por ejemplo, cuando el dominio de unión al antígeno es una región variable de anticuerpo, una vez que se obtiene un ADNc que codifica la región variable, el ADNc se digiere con enzimas de restricción que reconocen los sitios de restricción insertados en los dos extremos del ADNc. Preferiblemente, las enzimas de restricción reconocen y digieren una secuencia de nucleótidos que aparece con frecuencia baja en la secuencia de nucleótidos que compone el gen de la molécula de unión al antígeno. Además, se insertan preferiblemente enzimas de restricción que proporcionan extremos cohesivos para insertar una única copia de un fragmento digerido en el vector en la orientación correcta. El ADNc que codifica una región variable de una molécula de unión al antígeno digerido como se ha descrito antes se inserta en un vector de expresión adecuado para obtener un vector de expresión para la molécula de unión al antígeno de la presente descripción.

El polinucleótido que codifica un dominio de unión al antígeno obtenido como se ha descrito antes se une operativamente al gen que codifica un dominio de unión al FcRn que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido y un dominio de unión al receptor Fcγ que tiene actividad de unión selectiva a un receptor Fcγ, que se describen en las secciones "Dominio de unión al FcRn que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido" y "Dominio de unión al receptor Fcγ que tiene actividad de unión selectiva a un receptor Fcγ", respectivamente. Cuando se unen, los genes se pueden unir directamente en el marco, o los polinucleótidos que codifican cada dominio se pueden unir en el marco a través de conectores. Además de cada uno

de los dominios mencionados antes, puede estar operativamente unido con un gen que codifica el dominio de unión a FcγR descrito en la sección mencionada antes "Dominio de unión a FcγR".

5 Cuando se usa un anticuerpo como la molécula de unión al antígeno de la presente descripción, se puede usar adecuadamente un polinucleótido que codifica una región Fc de anticuerpo como el "dominio de unión al FcRn que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido y dominio de unión al receptor Fcγ que tiene actividad de unión selectiva a un receptor Fcγ" mencionados antes. También se pueden usar regiones Fc cuya "actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido" y "actividad de unión selectiva a un receptor Fcγ" se modifiquen adecuadamente por modificación de los polinucleótidos. Los ejemplos de realizaciones no limitantes de dichas modificaciones se muestran en las secciones mencionadas antes "Dominio de unión al FcRn que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido" y "Dominio de unión al receptor Fcγ que tiene actividad de unión selectiva a un receptor Fcγ", respectivamente.

15 Para producir una molécula de unión al antígeno de interés, se inserta un polinucleótido que codifica la molécula de unión al antígeno de una manera operativamente unida a una secuencia reguladora en un vector de expresión. Las secuencias reguladoras incluyen, por ejemplo, potenciadores y promotores. Además, se puede unir una secuencia señal adecuada al extremo amino de modo que la molécula de unión al antígeno expresada sea secretada al exterior de las células. Como secuencia señal, por ejemplo, se usa un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos MGWSCILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 4); sin embargo, también se pueden unir otras secuencias señal adecuadas. El polipéptido expresado se escinde en el extremo carboxilo de la secuencia descrita antes, y el polipéptido escindido es secretado como un polipéptido maduro al exterior de las células. Después, las células hospedantes adecuadas se transforman con este vector de expresión de modo que se puedan obtener células recombinantes que expresan el polinucleótido que codifica la molécula de unión al antígeno de interés. Las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción se pueden producir a partir de las células recombinantes siguiendo los métodos descritos antes en la sección sobre anticuerpos.

25 Para un ácido nucleico, "operativamente unido" significa que el ácido nucleico tiene una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un ADN que codifica una presecuencia o un líder secretor está operativamente unido a un ADN que codifica un cierto polipéptido si se va a expresar como una proteína precursora implicada en la secreción del polipéptido. Un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia codificante. Un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está en una posición que facilita la traducción. En general, "operativamente unido" significa que las secuencias de ADN unidas son contiguas, y en el caso de un líder secretor, significa que las secuencias de ADN unidas son contiguas y están en un marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se logra mediante la ligadura en sitios de restricción adecuados. Si dichos sitios no existen, se usan adaptadores o conectores oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional. Además, los ácidos nucleicos unidos se pueden producir mediante la técnica de PCR de extensión de solapamiento mencionada antes.

40 En una realización no limitante de la presente descripción, después de aislar un polinucleótido que codifica la molécula de unión al antígeno descrita antes cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de unas condiciones seleccionada, se inserta una variante del polinucleótido en un vector de expresión adecuado. Dichas variantes incluyen preferiblemente las preparadas por humanización basada en la secuencia de polinucleótidos que codifica una molécula de unión al antígeno de la presente descripción obtenida por cribado como una biblioteca de regiones variables aleatorizada, una biblioteca sintética o una biblioteca inmunitaria construida que se crea a partir de animales no humanos. Los mismos métodos descritos antes para producir anticuerpos humanizados descritos antes se pueden usar como un método para producir variantes de moléculas de unión al antígeno humanizadas.

45 En otra realización, dichas variantes incluyen preferiblemente las obtenidas introduciendo una alteración que aumenta la afinidad por el antígeno (maduración de afinidad) de una molécula de unión al antígeno de la presente descripción en una secuencia de polinucleótido aislada para la molécula obtenida por cribado usando una biblioteca sintética o una biblioteca *naïve* como una biblioteca de regiones variables aleatorizada. Dichas variantes se pueden obtener por diferentes procedimientos conocidos para la maduración de afinidad, que incluyen la mutagénesis de CDR (Yang et al. (*J. Mol. Biol.* (1995) 254, 392-403)), barajado de cadena (Marks et al. (*Bio/Technology* (1992) 10, 779-783)), uso de cepas mutantes de *E. coli* (Low et al. (*J. Mol. Biol.* (1996) 250, 359-368)), barajado de ADN (Patten et al. (*Curr. Opin. Biotechnol.* (1997) 8, 724-733)), presentación en fagos (Thompson et al. (*J. Mol. Biol.* (1996) 256, 77-88)), y PCR sexual (Clameri et al. (*Nature* (1998) 391, 288-291)).

55 En una realización de variantes de la presente descripción, los polinucleótidos que codifican moléculas de unión al antígeno que tienen una cadena pesada donde un polinucleótido que codifica una región Fc modificada para tener una mutación de aminoácido como se ha descrito antes, están unido en el marco a un polinucleótido que codifica el dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión varía dependiendo de unas condiciones seleccionadas descrito antes.

60 La presente descripción proporciona métodos para producir moléculas de unión al antígeno, que comprenden recoger las moléculas de unión al antígeno de medios de cultivo de células a las que se han introducido vectores en los que un polinucleótido que codifica una región Fc está operativamente unido en el marco a un polinucleótido que codifica

un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones. Además, la presente descripción también proporciona métodos para producir moléculas de unión al antígeno, que comprenden recoger las moléculas de unión al antígeno de medios de cultivo de células en las que se han introducido vectores contruidos uniendo operativamente un polinucleótido que codifica un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión varía dependiendo de las condiciones de concentración de iones a un polinucleótido que codifica una región Fc que se une operativamente a un vector con antelación.

En los "Métodos para producir moléculas de unión al antígeno" de la presente descripción, se pueden usar métodos conocidos como métodos para evaluar la eliminación de antígeno del plasma por las moléculas de unión al antígeno. Una molécula de unión al antígeno de la presente descripción se administra a cada grupo de animales no humanos tales como ratones a una edad adecuada en el mes. Como se describe más adelante en la sección "Composición farmacéutica", la molécula de unión al antígeno se puede administrar de forma sistémica o local por inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, inyección intracraneal, o similares, como composiciones en la forma farmacéutica para inyecciones, administración transnasal, administración transpulmonar o administración transdérmica.

Se pueden usar métodos espectroscópicos tales como resonancia magnética nuclear (RMN) o los análisis de espectrometría de masas (MS) que incluyen SELDI(-TOF), MALDI(-TOF), análisis basado en gel 1D, análisis basado en gel 2D, cromatografía líquida (por ejemplo, cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC) o cromatografía de líquidos a baja presión (LPLC), cromatografía en capa fina y técnicas basadas en LC-MS para medir las concentraciones. Los ejemplos de técnicas adecuadas de LCMS incluyen ICAT (marca registrada) (Applied Biosystems) e iTRAQ (marca registrada) (Applied Biosystems). También se puede usar un método para detectar fragmentos de antígeno que se han producido por digestión adicional de un antígeno dirigido por una enzima adecuada cuando sea adecuado. Además, la concentración de antígeno se puede medir por un método de detección directa o indirecta. Más específicamente, el antígeno se puede detectar directa o indirectamente por interacción con un ligando o ligandos tales como enzimas, proteínas de unión, receptores o transporte, anticuerpos, péptidos, aptámeros u oligonucleótidos, o cualquier receptor o compuesto químico sintético que pueda unirse específicamente al antígeno. El ligando se puede modificar con un marcador detectable tal como un marcador luminiscente, un marcador fluorescente o un marcador radiactivo, y/o un marcador de afinidad. Se puede dar un método inmunológico como ejemplo.

Un método de medición preferido puede ser, por ejemplo, un método inmunológico que usa un anticuerpo que se une a un epítipo presente en el antígeno. Los ejemplos de dicho método inmunológico incluyen inmunoensayo enzimático (ELISA, EIA), fluoroinmunoensayo (FIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo de luminiscencia (LIA), técnica de anticuerpos enzimáticos, técnica de anticuerpos fluorescentes, método de inmunocromatografía, inmunoturbidimetría, turbidimetría de látex y método de medición de aglutinación en látex. Además, las mediciones en estos métodos inmunológicos se pueden llevar a cabo manualmente o usando un dispositivo tal como un analizador. El método inmunológico en la presente descripción se puede llevar a cabo de acuerdo con un método conocido tal como el método en sándwich. Por ejemplo, un primer anticuerpo inmovilizado sobre un portador se deja que reaccione simultánea o secuencialmente con una muestra biológica y un segundo anticuerpo modificado por una sustancia marcadora. La reacción mencionada antes conduce a la formación de un complejo que comprende el primer anticuerpo inmovilizado sobre un portador, el antígeno y un segundo anticuerpo modificado por una sustancia marcadora, y la cuantificación de la sustancia marcadora unida al segundo anticuerpo incluido en este complejo permite la medición de la cantidad (concentración) del antígeno incluido en la muestra biológica.

Por ejemplo, en el caso del inmunoensayo enzimático, se usan preferiblemente una microplaca sobre la cual se inmoviliza un primer anticuerpo, muestras biológicas diluidas de forma seriada, un anticuerpo secundario modificado por una enzima tal como HRP, tampón de lavado y una solución que contiene un sustrato con el cual reacciona una enzima tal como HRP. En una realización no limitante de la medición, se permite que un sustrato reaccione en condiciones óptimas con la enzima que modifica el anticuerpo secundario, y la cantidad del producto de reacción enzimática se puede determinar por un método óptico. En el caso del fluoroinmunoensayo, se usan preferiblemente una guía de ondas ópticas sobre la cual se inmoviliza un primer anticuerpo, muestras biológicas diluidas de forma seriada, un anticuerpo secundario modificado por una sustancia fluorescente y tampón de lavado. En una realización no limitante de la medición, se puede medir la intensidad de la fluorescencia emitida por la sustancia fluorescente a través de la irradiación de luz de excitación sobre la sustancia fluorescente que modifica el anticuerpo secundario.

Además, en el caso del radioinmunoensayo, se mide la cantidad de radiación emitida por la sustancia radiactiva. En el caso del inmunoensayo de luminiscencia, se mide la cantidad de luminiscencia emitida por el sistema de reacción luminiscente. Además, en el caso de la inmunoturbidimetría, la turbidimetría látex, método de medición de aglutinación en látex y similares, la luz transmitida o la luz dispersa se miden por el método del punto final o el método de velocidad. Cuando las mediciones de inmunocromatografía se hacen por observación visual, el color de la sustancia marcada que aparece en la línea de ensayo se determina por observación visual. En lugar de dicha medición por observación visual, se puede usar un instrumento tal como un analizador cuando sea adecuado.

Composición farmacéutica

La presente descripción se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden moléculas de unión al antígeno

- de la presente descripción, moléculas de unión al antígeno producidas por métodos de alteración de la presente descripción, o moléculas de unión al antígeno producidas por métodos de producción de la presente descripción. Las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción o las moléculas de unión al antígeno producidas por los métodos de producción de la presente descripción son útiles como composiciones farmacéuticas ya que, cuando se administran, tienen el fuerte efecto de reducir la concentración de antígeno en el plasma en comparación con las moléculas de unión al antígeno típicas y presentan mejores respuesta inmunitaria in vivo, farmacocinética y otras en animales a los que se ha administrado las moléculas. Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden comprender vehículos farmacéuticamente aceptables.
- En la presente descripción, las composiciones farmacéuticas se refieren en general a agentes para tratar o prevenir, o ensayar/diagnosticar enfermedades.
- Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se pueden formular por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar por vía parenteral, en forma de inyecciones de soluciones o suspensiones estériles que incluyen agua u otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, dichas composiciones se pueden formular mezclando en forma de dosis unitaria requerida en la práctica de fabricación de medicamentos generalmente aprobada, mediante la combinación adecuada con vehículos o medios farmacológicamente aceptables, específicamente con agua estéril, solución salina fisiológica, aceite vegetal, emulsionante, suspensión, tensioactivo, estabilizante, agente aromatizante, excipiente, vehículo, conservante, aglutinante o similar. En dichas formulaciones, la cantidad de ingrediente activo se ajusta para obtener una cantidad adecuada en un intervalo predeterminado.
- Las composiciones estériles para inyección se pueden formular usando vehículos tales como agua destilada para inyección, de acuerdo con la práctica de la formulación convencional. Las soluciones acuosas para inyección incluyen, por ejemplo, soluciones salinas fisiológicas e isotónicas que contienen dextrosa u otros adyuvantes (por ejemplo, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro de sodio). También se pueden usar en combinación solubilizantes adecuados, por ejemplo, alcoholes (etanol y similares), polialcoholes (propilenglicol, polietilenglicol y similares), tensioactivos no iónicos (polisorbato 80(TM), HCO-50 y similares).
- Los aceites incluyen aceite de sésamo y aceites de soja. El benzoato de bencilo y/o el alcohol bencílico se pueden usar en combinación como solubilizantes. También se pueden combinar tampones (por ejemplo, tampón de fosfato y tampón de acetato de sodio), agentes calmantes (por ejemplo, hidrocioruro de procaína), estabilizantes (por ejemplo, alcohol bencílico y fenol) y/o antioxidantes. Se llenan ampollas adecuadas con las inyecciones preparadas.
- Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se administran preferiblemente por vía parenteral. Por ejemplo, las composiciones se administran en la forma farmacéutica para inyecciones, administración transnasal, administración transpulmonar o administración transdérmica. Por ejemplo, se pueden administrar de forma sistémica o local mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea o similares.
- Los métodos de administración se pueden seleccionar de manera adecuada teniendo en cuenta la edad y los síntomas del paciente. La dosis de una composición farmacéutica que contiene una molécula de unión al antígeno puede ser, por ejemplo, de 0.0001 mg a 1000 mg/kg para cada administración. Alternativamente, la dosis puede ser, por ejemplo, de 0.001 a 100 000 mg por paciente. Sin embargo, la presente descripción no está limitada por los valores numéricos descritos antes. Las dosis y los métodos de administración varían dependiendo del peso, edad, síntomas del paciente y similares. Los expertos en la técnica pueden establecer dosis adecuadas y métodos de administración teniendo en cuenta los factores descritos antes.
- Además, la presente descripción proporciona kits para usar en los métodos de la presente descripción, que comprenden al menos una molécula de unión al antígeno de la presente descripción. Además de lo anterior, se pueden incluir en los kits vehículos farmacéuticamente aceptables, medios, manuales de instrucciones que describen el método de uso y similares.
- Además, la presente descripción se refiere a agentes farmacéuticos para eliminar, del plasma, complejos que contienen dos o más unidades de unión al antígeno y dos o más moléculas de unión al antígeno presentes en el plasma, que contienen como ingrediente activo las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción o las moléculas de unión al antígeno producidas por los métodos de producción de la presente descripción.
- La presente descripción se refiere a métodos para tratar una enfermedad, que incluyen administrar a sujetos (pacientes, sujetos humanos, etc.) las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción o las moléculas de unión al antígeno producidas por los métodos de producción de la presente descripción. Un ejemplo no limitante de la enfermedad incluye cáncer y enfermedades inflamatorias.
- La presente descripción también se refiere al uso de las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción o las moléculas de unión al antígeno producidas por los métodos de producción de la presente descripción en la fabricación de un agente farmacéutico para eliminar del plasma complejos que contienen dos o más unidades de unión al antígeno y dos o más moléculas de unión al antígeno presentes en el plasma.

La presente descripción se refiere además al uso de las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción o las moléculas de unión al antígeno producidas por los métodos de producción de la presente descripción para eliminar del plasma complejos que contienen dos o más unidades de unión antigénica y dos o más moléculas de unión al antígeno presentes en el plasma.

- 5 Además, la presente descripción se refiere a moléculas de unión al antígeno de la presente descripción y a moléculas de unión al antígeno producidas por los métodos de producción de la presente descripción para su uso en los métodos de la presente descripción.

Los aminoácidos contenidos en las secuencias de aminoácidos de la presente descripción se pueden modificar postraduccionalmente (por ejemplo, los expertos en la técnica conocen bien la modificación de una glutamina N-terminal en un ácido piroglutámico por piroglutamilación). Naturalmente, dichos aminoácidos modificados postraduccionalmente se incluyen en las secuencias de aminoácidos en la presente descripción.

En el presente documento a continuación, la presente invención se describirá específicamente con referencia a los ejemplos.

Ejemplos

- 15 Ejemplo 1. Preparación de moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al FcγR de ratón en unas condiciones de intervalo de pH neutro es mayor que la actividad de unión de la región Fc de IgG humana natural

(1-1) Anticuerpos de unión al receptor de IL-6 humano dependiente del pH

H54/L28-IgG1 que comprende H54-IgG1 (SEQ ID NO: 36) y L28-CK (SEQ ID NO: 37) descrito en el documento WO2009/125825 es un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado. Por otro lado, Fv4-IgG1 que comprende VH3-IgG1 (SEQ ID NO: 38) y VL3-CK (SEQ ID NO: 39) es un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado que resulta de conferir, a H54/L28-IgG1, la propiedad de unirse al receptor de IL-6 humano soluble de una manera dependiente del pH (que se une a pH 7.4 y se disocia a pH 5.8). El ensayo de ratones in vivo descrito en el documento WO2009/125825 demostró que, en el grupo al que se administró una mezcla de Fv4-IgG1 y el receptor de IL-6 humano soluble como antígeno, la eliminación del receptor de IL-6 humano soluble del plasma se aceleró significativamente en comparación con el grupo al que se administró una mezcla de H54/L28-IgG1 y un receptor de IL-6 humano soluble como antígeno.

El receptor de IL-6 humano soluble unido a H54/L28-IgG1, que es un anticuerpo que se une a un receptor de IL-6 humano soluble, junto con el anticuerpo, se recircula al plasma por FcRn. Por otro lado, Fv4-IgG1, que es un anticuerpo que se une a un receptor de IL-6 humano soluble de manera dependiente del pH, disocia el receptor de IL-6 humano soluble en condiciones ácidas en el endosoma. El receptor de IL-6 humano soluble disociado se degrada en los lisosomas, por lo que esto permite una aceleración considerable de la eliminación del receptor de IL-6 humano soluble.

Además, después de unirse al FcRn en el endosoma, Fv4-IgG1, que es un anticuerpo que se une a un receptor de IL-6 humano soluble de manera dependiente del pH, se recircula al plasma. Puesto que el anticuerpo recirculado se puede unir al receptor de IL-6 humano soluble nuevamente, el anticuerpo se une repetidamente al antígeno (receptor de IL-6 humano soluble) y es recirculado por FcRn al plasma. Se cree que, como resultado, una sola molécula de anticuerpo puede unirse repetidamente varias veces al receptor de IL-6 humano soluble (Fig. 1).

(1-2) Preparación de un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano con unión mejorada al FcγR de ratón y anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano sin unión de FcγR de ratón

Se preparó VH3-IgG1-F1022 (SEQ ID NO: 40), una molécula de unión al antígeno con unión al FcγR de ratón mejorada, sustituyendo Lys por Asp en la posición 326 (numeración EU) y Leu por Tyr en la posición 328 (numeración EU) en VH3-IgG1. Fv4-IgG1-F1022 que contiene VH3-IgG1-F1022 como la cadena pesada y VL3-CK como la cadena ligera se produjo usando el método descrito en el Ejemplo de referencia 1.

Por otro lado, se preparó VH3-IgG1-F760 (SEQ ID NO: 41), una molécula de unión al antígeno sin unión a FcγR de ratón, sustituyendo Leu por Arg en la posición 235 y Ser por Lys en la posición 239 (numeración EU) en VH3-IgG1. Fv4-IgG1-F760 que contiene VH3-IgG1-F760 como la cadena pesada y VL3-CK como la cadena ligera se produjo usando el método descrito en el Ejemplo de referencia 1.

(1-3) Evaluación de la actividad de unión al FcγR de ratón

VH3/L(WT)-IgG1, VH3/L(WT)-IgG1-F1022 y VH3/L(WT)-IgG1-F760, que contienen VH3-IgG1, VH3-IgG1-F1022 y VH3-IgG1-F760 como la cadena pesada, y L(WT)-CK (SEQ ID NO: 42) como la cadena ligera, se produjeron usando el método descrito en el ejemplo de referencia 1. Estos anticuerpos se analizaron cinéticamente para determinar su unión al FcγR de ratón como se describe a continuación.

(1-4) Análisis cinético de la unión al FcγR de ratón

La unión de anticuerpos a FcγRI, FcγRIIb, FcγRIII y FcγRIV de ratón (en lo sucesivo, denominados los FcγR de ratón) (R & D systems, SinoBiological, o preparados por el método descrito en el ejemplo de referencia 2) se analizó

cinéticamente usando Biacore T100 y T200 (GE Healthcare). Se inmovilizó una cantidad adecuada de proteína L (ACTIGEN o BioVision) en un chip sensor CM4 (GE Healthcare) por un método de acoplamiento de amino, y se capturaron anticuerpos de interés en el mismo. Después se inyectaron soluciones diluidas de Fc γ R de ratón y un tampón en análisis como un blanco, y se permitió que los Fc γ R de ratón interaccionasen con anticuerpos capturados sobre el chip sensor. El tampón de análisis usado era ACES 20 mmol/l, NaCl 150 mmol/l, Tween20 al 0.05% (p/v), pH 7.4. Este tampón también se usó para diluir los Fc γ R de ratón. El chip sensor se regeneró usando glicina-HCl 10 mmol/l, pH 1.5. Todas las mediciones se llevaron a cabo a 25°C. La constante de velocidad de unión k_a (1/Ms) y la constante de velocidad de disociación k_d (1/s), que son parámetros cinéticos, se calcularon a partir de los sensorgramas obtenidos por la medición. Se calculó la K_D (M) de cada anticuerpo para Fc γ R humano basándose en los valores. Cada parámetro se calculó usando el software de evaluación Biacore T100 o T200 (GE Healthcare).

El resultado mostrado en la Tabla 6 se obtuvo por la medición. Se demostró que VH3/L (WT) -IgG1-F1022 tenía una mayor actividad de unión a mFc γ RI, mFc γ RII y mFc γ RIII en comparación con VH3/L (WT)-IgG1. Con respecto a VH3/L (WT)-IgG1-F760, la unión a los diversos Fc γ R de ratón era indetectable, lo que demuestra que VH3/L (WT)-IgG1-F760 carece de la actividad de unión a los diversos Fc γ R de ratón. En la tabla, VH3/L (WT)-IgG1, VH3/L (WT)-IgG1-F1022 y VH3/L (WT)-IgG1-F760 se muestran como IgG1, F1022 y F760, respectivamente.

Tabla 6

Nombre de variante	KD (M)			
	mFc γ RI	mFc γ RII	mFc γ RIII	mFc γ RIV
IgG1	5.3E-08	9.8E-07	2.4E-06	8.6E-08
F1022	7.6E-09	1.0E-08	5.5E-09	1.4E-07
F760	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado

(1-5) Preparación de anticuerpos con bajo contenido de fucosa

Los métodos conocidos para aumentar la actividad de unión a Fc γ R de los anticuerpos incluyen métodos para hacer que las cadenas de azúcar unidas a un anticuerpo sean cadenas de azúcar con bajo contenido de fucosa (*J. Biol. Chem.* (2003) 278, 3466-3473) además de los métodos para introducir una alteración de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo. Se produjo un Fv4-IgG1 con bajo contenido de fucosa (en lo sucesivo abreviado como Fv4-IgG1-Fuc) expresando Fv4-IgG1 usando células CHO deficientes en el gen transportador de fucosa (documento WO 2006/067913) como células hospedantes de acuerdo con el método descrito en el ejemplo de referencia 1. Se ha descrito que, de los mFc γ R (receptores Fc γ de ratón), los anticuerpos con bajo contenido de fucosa han aumentado selectivamente la actividad de unión a Fc γ RIV (*Science*, 2005, 310 (5753) 1510-1512).

Ejemplo 2. Efecto de eliminación de antígenos del plasma por moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a Fc γ R es mayor que la actividad de unión a la región Fc de la IgG humana natural

(2-1) Efecto de H54/L28-IgG1 y Fv4-IgG1 para eliminar antígenos del plasma

H54/L28-IgG1, que es un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano, y Fv4-IgG1 que tiene la propiedad de unirse al receptor de IL-6 humano de una manera dependiente del pH se produjeron por el método descrito en el ejemplo de referencia 1. Se llevaron a cabo ensayos de infusión in vivo usando los H54/L28-IgG1 y Fv4-IgG1 producidos por el método descrito a continuación.

(2-1-1) Ensayos de infusión in vivo usando ratones transgénicos con FcRn humano

Se creó un modelo animal en el que la concentración del receptor de IL-6 humano soluble se mantiene constante en el plasma mediante la implantación de una bomba de infusión (MINI-OSMOTIC PUMP MODEL2004, alzet) que contiene el receptor de IL-6 humano soluble, debajo de la piel en la parte posterior de ratones transgénicos con FcRn humano (ratón Tg línea 32 +/- B6.mFcRn -/-, hFcRn, Jackson Laboratories, *Methods Mol Biol.* (2010) 602, 93-104). Se evaluó la dinámica in vivo después de la administración de un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano en el modelo animal. Para suprimir la producción de anticuerpos neutralizantes contra el receptor de IL-6 humano soluble, se administró un anticuerpo monoclonal anti-CD4 de ratón (preparado por un método conocido) una vez en 20 mg/kg en la vena caudal. Después, se implantó por vía subcutánea una bomba de infusión que contenía 92.8 μ g/ml del receptor de IL-6 humano soluble en el lomo de los ratones. Tres días después de la implantación de la bomba de infusión, se administró un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano una vez en 1 mg/kg en la vena caudal. La sangre se recogió de los ratones 15 minutos, siete horas, un día, dos días, cuatro días y siete días después de la administración del anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano. Inmediatamente, la sangre recogida se centrifugó a 15.000 rpm y 4°C durante 15 minutos para preparar plasma. El plasma aislado se almacenó en un congelador ajustado a -20°C o menos hasta su uso.

(2-1-2) Determinación de la concentración de receptor de IL-6 humano soluble hsIL-6R en el plasma por un método electroquimioluminiscente

Las concentraciones de receptor de IL-6 humano soluble hslIL-6R en el plasma de ratón se determinaron por un método electroquimioluminiscente. Las muestras de la curva de referencia del receptor de IL-6 humano soluble hslIL-6R preparadas en 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 pg/ml y las muestras de ensayo de plasma de ratón diluidas 50 veces o más se mezclaron con anticuerpo anti-IL-6R humano monoclonal (R&D), anticuerpo anti-IL-6R humano biotilado (R&D), Tocilizumab, que había sido rutenado con éster de sulfo-marcador-NHS (Meso Scale Discovery). Las mezclas se incubaron a 37°C durante la noche. Tocilizumab se preparó en una concentración final de 333 µg/ml. Después, las mezclas de reacción se dividieron en partes alícuotas en una placa de estreptavidina MA400 PR (Meso Scale Discovery). La solución que había reaccionado a temperatura ambiente durante una hora se lavó y después se dividió en partes alícuotas Read Buffer T (x4) (Meso Scale Discovery). Inmediatamente después, se llevó a cabo la medición usando SECTOR PR 400 Reader (Meso Scale Discovery). La concentración del receptor de IL-6 humano soluble hslIL-6R se determinó basándose en la respuesta de la curva de referencia usando el software de análisis SOFTmax PRO (Molecular Devices).

En la Fig. 2 se muestra una evolución temporal de la concentración del receptor IL-6 humano seguida. En comparación con H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1 que se une al receptor de IL-6 humano de una manera dependiente del pH podía reducir la concentración del receptor de IL-6 humano, pero no podía reducirla por debajo del valor base sin la administración de anticuerpos. Es decir, el anticuerpo administrado que se une a un antígeno de una manera dependiente del pH no podía reducir la concentración de antígeno en el plasma por debajo del nivel anterior a la administración del anticuerpo.

(2-2) El efecto de eliminar un antígeno del plasma por un anticuerpo con actividad de unión al FcγR aumentada o reducida

El método descrito a continuación evaluó si en la evolución temporal de la concentración del receptor de IL-6 humano influye el aumento o reducción de la actividad de unión a FcγR de Fv4-IgG1, que es un anticuerpo de unión al receptor de IL-6 humano dependiente del pH. Usando Fv4-IgG1, Fv4-IgG1-F760, Fv4-IgG1-F1022 y Fv4-IgG1-Fuc preparados como se describe en el ejemplo 1, se llevaron a cabo ensayos de infusión in vivo por el método descrito a continuación.

(2-2-1) Ensayos de infusión in vivo usando ratones transgénicos con FcRn humano

Se creó un modelo animal en el que la concentración del receptor de IL-6 humano soluble se mantiene constante en el plasma por implantación de una bomba de infusión (MINI-OSMOTIC PUMP MODEL2004, alzet) que contiene el receptor de IL-6 humano soluble debajo de la piel en el lomo de ratones transgénicos con FcRn humano (ratón Tg línea 32 +/- B6.mFcRn -/- hFcRn, Jackson Laboratories, *Methods Mol Biol.* (2010) 602, 93-104). En el modelo animal, se administró un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano simultáneamente con Sanglopor (CSL Behring) que es una preparación de inmunoglobulina humana, para evaluar la dinámica in vivo del receptor de IL-6 humano soluble después de la administración de anticuerpos. Para suprimir la producción de anticuerpos neutralizantes contra el receptor de IL-6 humano soluble, se administró un anticuerpo monoclonal anti-CD4 de ratón (preparado por un método conocido) una vez en 20 mg/kg en la vena caudal. Después, se implantó por vía subcutánea una bomba de infusión que contenía 92.8 µg/ml del receptor de IL-6 humano soluble en lomo de los ratones. Tres días después de la implantación de la bomba de infusión, se administraron un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano y Sanglopor una vez en 1 mg/kg y 1000 mg/kg, respectivamente, en la vena caudal. Se recogió la sangre de los ratones 15 minutos, siete horas, un día, dos días, cuatro días, siete días, 14 días y 21 días después de la administración del anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano. La sangre se recogió de los ratones 15 minutos, siete horas, un día, dos días, tres días, siete días, 14 días y 21 días después de la administración del anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano. Inmediatamente, la sangre recogida se centrifugó a 15.000 rpm y 4°C durante 15 minutos para preparar el plasma. El plasma aislado se almacenó en un congelador a -20°C o menos hasta su uso.

(2-2-2) Determinación de la concentración de receptor de IL-6 humano soluble (hslIL-6R) en el plasma por un método electroquimioluminiscente

Las concentraciones de receptor de IL-6 humano soluble hslIL-6R en el plasma de ratón se determinaron por el mismo método electroquimioluminiscente que se describe en (2-1-2).

El resultado se muestra en la fig. 3. Se demostró que la evolución temporal de la concentración del receptor de IL-6 humano en el plasma de ratones a los que se administró Fv4-IgG1-F760, de los que se elimina la unión a FcγR de ratón de Fv4-IgG1, era comparable a la de los ratones a los que se administró Fv4-IgG1. La actividad citotóxica para un antígeno de membrana depende de la unión a FcγR y, por lo tanto, la actividad citotóxica se pierde al eliminar la unión a FcγR. Por otro lado, incluso cuando se administra un anticuerpo, del que se elimina la unión a FcγR de ratón, contra el receptor de IL-6 humano que es un antígeno soluble, no había efecto en la evolución temporal de la concentración del receptor de IL-6 humano en el plasma de los ratones a los que se había administrado. Por lo tanto, se pensaría que la unión a FcγR de un anticuerpo contra el antígeno soluble no contribuye a la evolución temporal de la concentración de antígeno en el plasma de ratones a los que se administró el anticuerpo.

Sorprendentemente, sin embargo, la concentración de receptor de IL-6 humano en el plasma de ratones a los que se administró Fv4-IgG1-F1022 con unión a FcγR de ratón mejorada se redujo considerablemente en comparación con la concentración de receptor de IL-6 humano en el plasma de ratones a los que se administró Fv4-IgG1. En cuanto al grado de reducción, se confirmó que la concentración disminuía por debajo del valor base de concentración de receptor

de IL-6 humano sin administración de anticuerpos. En particular, la concentración de receptor de IL-6 humano en el plasma de ratones a los que se administró Fv4-IgG1-F1022 se redujo a aproximadamente 1/100 tres días después de la administración en comparación con el caso de la administración de Fv4-IgG1. Este hallazgo demuestra que, al administrar a ratones un anticuerpo que se une al receptor de IL-6 humano de una manera dependiente del pH y cuya unión a FcγR ha mejorado, la concentración de receptor de IL-6 humano en el plasma de los ratones se puede reducir significativamente, y en cuanto al grado de reducción, la concentración de antígeno en el plasma se puede reducir por debajo del nivel antes de la administración de anticuerpos.

Además, también se demostró que, en comparación con ratones a los que se administró Fv4-IgG1, la concentración de receptor de IL-6 humano en el plasma se reducía en los ratones a los que se administró Fv4-IgG1-Fuc que tiene cadenas de azúcar con bajo contenido de fucosa y con mayor actividad de unión a FcγR IV. En particular, la concentración de receptor de IL-6 humano en el plasma de ratones a los que se administró Fv4-IgG1-Fuc se reducía a aproximadamente 1/2 siete días después de la administración en comparación con el caso de la administración de Fv4-IgG1. El hallazgo anterior demuestra que, al administrar a ratones una molécula de unión al antígeno dependiente del pH que se une al receptor de IL-6 humano de una manera dependiente del pH y cuya unión a FcγR se ha mejorado, la concentración de antígeno soluble en el plasma de los ratones se puede reducir. En este caso, los métodos para mejorar la unión de FcγR no se limitan en particular a la introducción de alteraciones de aminoácidos. Se demostró que dicha mejora se puede lograr, por ejemplo, usando una región Fc de IgG humana a la que se une una cadena de azúcar con bajo contenido de fucosa en la posición 297 (numeración EU); sin embargo, el efecto de Fv4-IgG1-Fuc para reducir la concentración de antígeno era menor que Fv4-F1022. Basándose en este resultado, se pensaría que, de varios FcγR (FcγRI, II, III y IV para ratón), mFcγIV, en el que se mejora la unión de Fv4-IgG1-Fuc, no tiene una gran contribución a la reducción de la concentración de antígeno como un FcγR.

Por lo tanto, se puso de manifiesto que, al administrar a un individuo un anticuerpo que se une a un antígeno soluble de una manera dependiente del pH y cuya unión a FcγR se ha mejorado, la concentración de antígeno soluble en el plasma del individuo se puede reducir notablemente.

Sin estar limitados por una teoría particular, la reducción inesperada de la concentración de antígeno soluble en el plasma, que se observaba al administrar una molécula de unión al antígeno que comprende un dominio de unión al antígeno cuya unión a FcγR se ha mejorado y cuya actividad de unión al antígeno se altera dependiendo de las condiciones de concentración de iones, tales como el pH y un dominio de unión al FcRn que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido, se puede explicar como sigue.

Los anticuerpos IgG que se incorporan de forma no específica a las células vuelven a la superficie celular al unirse al FcRn en condiciones ácidas en el endosoma y después se disocian de FcRn en condiciones neutras en el plasma. En dicho caso, cuando un anticuerpo que neutraliza la función de un antígeno soluble por unión al antígeno se administra a ratones en los que la concentración del antígeno soluble se mantiene constante en el plasma, el antígeno soluble en el plasma forma un complejo con el anticuerpo administrado. Se cree que el antígeno soluble incorporado en las células mientras permanece como complejo se recircula, en un estado unido al anticuerpo, al plasma junto con el anticuerpo, porque la región Fc del anticuerpo se une al FcRn en las condiciones ácida en el endosoma.

Por otro lado, cuando el anticuerpo contra el antígeno soluble es un anticuerpo que se une al antígeno de una manera dependiente del pH (es decir, un anticuerpo que disocia del antígeno soluble en las condiciones ácidas en el endosoma), el antígeno soluble que no es específicamente incorporado en las células mientras permanece como un complejo con el anticuerpo, se disocia del anticuerpo en el endosoma y se degrada en el lisosoma en la célula; así, el antígeno soluble no se recircula al plasma. Es decir, se cree que Fv4-IgG1 incorporado como un complejo con el antígeno soluble en las células puede disociar el antígeno soluble en el endosoma y así acelerar la eliminación del antígeno soluble.

Como se ha descrito antes, se cree que las moléculas de unión al antígeno tales como Fv4-IgG1, que contienen un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno se altera dependiendo de la concentración de iones, son capaces de unirse a antígenos repetidamente varias veces. Se cree que el efecto para acelerar la eliminación de antígenos solubles del plasma al disociarlos en el endosoma depende de la velocidad de incorporación del complejo de antígeno/molécula de unión al antígeno en el endosoma. Una molécula de unión al antígeno que contiene un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión a varios FcγR se ha aumentado y cuya actividad de unión al antígeno se altera dependiendo de las condiciones de concentración de iones, se incorpora activamente en las células mediante la unión a varios FcγR expresados en la membrana celular, y puede transportarse nuevamente al plasma por recirculación a través de la unión entre FcRn y el dominio de unión al FcRn comprendido en la molécula, que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido. Es decir, se cree que, puesto que la molécula de unión al antígeno anterior que forma un complejo con un antígeno soluble en el plasma se incorpora activamente a las células a través del FcγR expresado en la membrana celular, su efecto para acelerar la eliminación del antígeno soluble del plasma se muestra de forma más notable que las moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a varios FcγR no se ha aumentado.

La actividad de unión al FcγR de un anticuerpo que se une a un antígeno de membrana tiene una función importante en la actividad citotóxica del anticuerpo. Por lo tanto, cuando es necesario que un anticuerpo usado como agente farmacéutico tenga actividad citotóxica, se usa un isotipo de IgG1 humana con una fuerte actividad de unión a FcγR.

Además, las técnicas para mejorar la actividad citotóxica de dichos anticuerpos al aumentar la actividad de unión a FcγR de los anticuerpos se usan habitualmente en la técnica.

Por otro lado, la función de la actividad de unión a FcγR de los anticuerpos que se unen a antígenos solubles y que se usan como agentes farmacéuticos no se conoce en la técnica. No ha habido una evaluación suficiente sobre qué diferencia en el efecto sobre el organismo vivo al que se administran los anticuerpos es causada por la diferencia en la actividad de unión a FcγR entre IgG1 humana con alta actividad de unión a FcγR y la IgG2 humana e IgG4 humana con baja actividad de unión a FcγR. En realidad, se demostró en el presente ejemplo que no había influencia en la evolución temporal de la concentración de antígeno soluble en el plasma de los individuos a los que se administra un anticuerpo que carece de actividad de unión a FcγR. Por otro lado, en la presente descripción, se puso de manifiesto que la concentración de antígeno soluble se reducía significativamente en el plasma de los individuos a los que se administró una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión a FcγR se ha aumentado y que contiene un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno soluble se altera dependiendo de las condiciones de concentración de iones. Específicamente, se puede decir que los autores de la presente invención pusieron de manifiesto por primera vez el beneficio de la mejora de la unión a FcγR combinando un dominio de unión al FcRn que tiene actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido con un dominio de unión al antígeno cuya unión al antígeno soluble se altera dependiendo de las condiciones de concentración de iones, comprendidos en una molécula de unión al antígeno dirigida a un antígeno soluble.

Ejemplo 3. Efecto de la eliminación de antígenos del plasma por moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al FcγR es mayor que la de la región Fc de IgG humana natural y cuya actividad de unión al FcRn humano se ha aumentado en unas condiciones de intervalo de pH ácido

(3-1) Preparación de moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al FcγR es mayor que la actividad de unión de la región Fc de IgG humana natural y cuya actividad de unión al FcRn humano se ha aumentado en unas condiciones de intervalo de pH ácido

Un método descrito para mejorar la retención de anticuerpos IgG en el plasma es mejorar la unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido. Se cree que, cuando se mejora la unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido introduciendo una sustitución de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo IgG, esto aumenta la eficacia de recirculación del endosoma al plasma, dando como resultado una mejora de la retención en el plasma del anticuerpo IgG.

Hay muchas descripciones sobre alteraciones de aminoácidos para mejorar la retención plasmática al mejorar la actividad de unión al FcRn humano en unas condiciones de intervalo de pH ácido. Dichas alteraciones incluyen, por ejemplo:

el método para sustituir Met por Leu en la posición 428 y Asn por Ser en la posición 434 (numeración EU) en un anticuerpo IgG (*Nat. Biotechnol.*, (2010) 28, 157-159); el método para sustituir Asn por Ala en la posición 434 (*Drug. Metab. Dispos.* (2010) 38 (4), 600-605); el método para sustituir Met por Tyr en la posición 252, Ser por Thr en la posición 254 y Thr por Glu en la posición 256 (*J. Biol. Chem.* (2006) 281, 23514-23524); el método para sustituir Thr por Gln en la posición 250 y Met por Leu en la posición 428 (*J. Immunol.* (2006) 176 (1) 346-356); el método para sustituir Asn por His en la posición 434 (*Clin. Pharm & Ther.* (2011) 89 (2) 283-290.); y documentos WO2010/106180; WO2010/045193; WO2009/058492; WO2008/022152; WO2006/050166, WO2006/053301, WO2006/031370; WO2005/123780; WO2005/047327; WO2005/037867; WO2004/035752; y WO2002/060919.

Se preparó VH3-IgG1-F109 (SEQ ID NO: 43) con una sustitución de Met por Leu en la posición 428 y Asn por Ser en la posición 434 (numeración EU) en VH3-IgG1-F1022 para mejorar la farmacodinámica de Fv4-IgG1-F1022 que se demostró que produce, cuando se administra, el efecto de reducir significativamente la concentración de antígeno soluble en el plasma, como se describe en el ejemplo 2. Fv4-IgG1-F1093 que comprende VH3-IgG1-F1093 como la cadena pesada y VL3-CK como la cadena ligera se construyó usando el método descrito en el ejemplo de referencia 1.

(3-2) Efecto de la eliminación de antígenos del plasma por moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a FcγR es mayor que la de la región Fc de IgG humana natural y cuya actividad de unión al FcRn humano se ha aumentado en unas condiciones de intervalo de pH ácido

Se llevó a cabo un ensayo de infusión in vivo para Fv4-IgG1-F1093 por el mismo método que se describe en el ejemplo (2-1-1) usando ratones transgénicos con FcRn humano en los que la concentración de receptor de IL-6 humano soluble se mantiene constante en el plasma. Las concentraciones del receptor de IL-6 humano soluble en el plasma de los ratones se determinaron por el método descrito en el ejemplo (2-1-2). El resultado se muestra en la fig. 4.

(3-2-1) Determinación de la concentración de anticuerpos anti-receptor de IL-6 humano en el plasma por el método ELISA

Las concentraciones de anticuerpos anti-receptor de IL-6 humano en el plasma de ratón se determinaron por el método ELISA. Primero, un fragmento de anticuerpo F(ab')₂ anti-IgG humana (específico de la cadena γ) se dividió en partes alícuotas en una placa Nunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge nunc International). La placa se dejó reposar a 4°C durante la noche para preparar una placa inmovilizada con anticuerpo anti-IgG humana. Se prepararon muestras de

la curva de referencia que contenían un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano (concentración en el plasma: 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 y 0.0125 µg/ml) y muestras de ensayo de plasma de ratón diluido 100 veces o más. Se combinaron 100 µl de cada una de las muestras de la curva de referencia y de ensayo con 200 µl de receptor de IL-6 humano soluble 20 ng/ml. Las mezclas resultantes se dejaron reposar a temperatura ambiente durante una hora, y se añadieron partes alícuotas a cada pocillo de la placa con el anticuerpo anti-IgG humana inmovilizado. Se dejó reposar la placa a temperatura ambiente durante otra hora. Después, se hizo reaccionar el anticuerpo anti-IL-6 humano biotinilado (R&D) a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, se hizo reaccionar estreptavidina-PoliHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) con el mismo a temperatura ambiente durante una hora. La reacción cromogénica de la solución de reacción se realizó usando como sustrato TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories). Después de terminar la reacción con ácido sulfúrico 1 N (Showa Chemical), se midió la absorbancia a 450 nm de la solución de reacción de cada pocillo con un lector de microplaca. Las concentraciones de anticuerpos en el plasma de ratón se determinaron basándose en la absorbancia de la curva de referencia usando el software de análisis SOFTmax PRO (Molecular Devices).

El resultado se muestra en la fig. 5.

(3-3) Mejora de la farmacodinámica aumentando la actividad de unión al FcRn humano en unas condiciones de intervalo de pH ácido

Como se muestra en la fig. 5, en el grupo al que se administraba Fv4-IgG1-F1022 que resulta de la mejora de la actividad de unión al FcγR de Fv4-IgG1 en unas condiciones de intervalo de pH neutro, se demostró que la retención plasmática del anticuerpo administrado se reducía en comparación con el grupo al que se administraba Fv4-IgG1. Por otro lado, en el grupo al que se administraba Fv4-IgG1-F1093 que resulta del aumento de la actividad de unión al FcRn humano de Fv4-IgG1-F1022 en unas condiciones de intervalo de pH ácido, se demostró que la retención plasmática del anticuerpo administrado mejoraba significativamente en comparación con el grupo al que se administraba Fv4-IgG1-F1022.

Además, como se muestra en la fig. 4, la evolución temporal de la concentración de receptor de IL-6 humano soluble en el plasma del grupo al que se administraba Fv4-IgG1-F1022 era equivalente a la del grupo al que se administraba Fv4-IgG1-F1093, hasta tres días después de la administración de anticuerpos. El día tres después de la administración, en comparación con el grupo al que se administraba Fv4-IgG1, la concentración de receptor de IL-6 humano soluble en el plasma se reducía aproximadamente 100 veces tanto en los grupos en los que se administró Fv4-IgG1-F1022 como Fv4-IgG1-F1093. Sin embargo, el día siete después de la administración de anticuerpos, se observó que la concentración de receptor de IL-6 humano soluble en el plasma era elevada en el grupo al que se administraba Fv4-IgG1-F1022 en comparación con el día tres después de la administración. Por otro lado, en el grupo al que se administraba Fv4-IgG1-F1093, no se observó un aumento en la concentración plasmática de receptor de IL-6 humano soluble, mostrando que el efecto para reducir la concentración de receptor de IL-6 humano soluble se mantenía en este grupo de administración.

Específicamente, Fv4-IgG1-F1093, cuando se administraba, reducía la concentración de receptor de IL-6 humano soluble en el plasma del individuo al que se administraba en aproximadamente 1/100 en comparación con Fv4-IgG1, y además, mantenía esta condición durante un periodo largo. Por lo tanto, se demostró que Fv4-IgG1-F1093 es una molécula de unión al antígeno excelente. Sin estar limitado por una teoría particular, el fenómeno observado en la presente memoria se puede explicar como sigue. Se cree que Fv4-IgG1-F1022 en el que se ha aumentado la actividad de unión al FcγR de Fv4-IgG1 en unas condiciones de intervalo de pH neutro se incorpora en una gran cantidad principalmente en células que expresan FcγR en la membrana celular. El anticuerpo incorporado se transfiere al endosoma y, al unirse al FcRn en el endosoma, el anticuerpo se recircula al plasma. Cuando la actividad de unión al FcRn del anticuerpo no es suficientemente alta en las condiciones de pH ácido en el endosoma, se cree que el anticuerpo incorporado en el endosoma es incapaz de recircular lo suficiente. Específicamente, una posible razón para la retención plasmática reducida de Fv4-IgG1-F1022 en relación con Fv4-IgG1 sería que la actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido es insuficiente para la recirculación suficiente del anticuerpo incorporado en el endosoma al plasma por unión al FcRn y el anticuerpo que no se recirculaba se degradaba en el lisosoma.

Por otro lado, al igual que con Fv4-IgG1-F1022, se cree que Fv4-IgG1-F1093 que resulta de la mejora de la actividad de unión al FcRn humano de Fv4-IgG1-F1022 en unas condiciones de intervalo de pH ácido se incorpora en una gran cantidad principalmente en células que expresan FcγR en la membrana celular. Un anticuerpo incorporado y transferido al endosoma se recircula al plasma uniéndose al FcRn en el endosoma. Puesto que se mejora su actividad de unión al FcRn humano en unas condiciones de intervalo de pH ácido, se cree que Fv4-IgG1-F1093 tiene suficiente actividad de unión al FcRn en el endosoma. Por lo tanto, después de la incorporación en las células, la mayor parte de Fv4-IgG1-F1093 se recircula al plasma. Por lo tanto, se pensaría que la retención plasmática de Fv4-IgG1-F1093 mejoraba en individuos a los que se administró en comparación con Fv4-IgG1-F1022.

Por otro lado, se sabe que la retención plasmática de anticuerpos ordinarios mejora cuando su actividad de unión al FcRn mejora en unas condiciones de intervalo de pH ácido. Sin embargo, se cree que, cuando se mejora la retención plasmática de anticuerpos, también se mejora la retención en el plasma de antígenos unidos a anticuerpos, y esto da como resultado un aumento de la concentración de antígeno en el plasma. En realidad, como se describe en el documento WO2010/088444, el anticuerpo 18E con la alteración YTE introducida en el anticuerpo 18, que es un

anticuerpo IgG1 humano contra IL-6, para aumentar la actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido, mostró una retención de anticuerpos mejorada en el plasma de macacos cangrejeros, y al mismo tiempo, la concentración del antígeno IL-6 también se elevó en el plasma.

Sin embargo, sorprendentemente, cuando se administra Fv4-IgG1-F1093 con una alteración introducida similar a YTE para aumentar la actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido en Fv4-F1022 que se une al antígeno de una manera dependiente del pH y tiene mayor actividad de unión a FcγR, la retención plasmática del anticuerpo mejoraba significativamente en los individuos a los que se había administrado sin aumentar la concentración del receptor de IL-6 humano soluble que es el antígeno. Más bien, el día siete después de la administración de anticuerpo, la concentración del receptor de IL-6 humano soluble permanecía baja en los individuos que recibieron Fv4-IgG1-F1093 en comparación con los que recibieron Fv4-F1022.

Sin estar limitado por una teoría particular, el fenómeno observado en la presente memoria se puede explicar como sigue. Cuando se administraba a un organismo vivo, un anticuerpo sin unión al antígeno dependiente del pH no se incorpora de forma específica a las células. Los antígenos que quedan para unirse al anticuerpo son recirculados al plasma en la misma medida que el anticuerpo. Por otro lado, para un anticuerpo con una mayor actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido, el nivel de recirculación al plasma en un organismo vivo que recibe el anticuerpo es mayor que el de un anticuerpo sin actividad de unión al FcRn aumentada, y esto da como resultado un mayor nivel de recirculación al plasma de antígenos unidos al antígeno en el organismo vivo. Por lo tanto, debido a la mejor retención plasmática del anticuerpo administrado en el organismo vivo, se cree que la concentración plasmática del antígeno al que se une el anticuerpo también aumenta en el organismo vivo.

Por otro lado, cuando se administra a un organismo vivo, un anticuerpo que se une a un antígeno de una manera dependiente del pH y que tiene una mayor actividad de unión al FcγR, se incorpora principalmente a las células que expresan FcγR en la membrana celular, y esto reduce la retención plasmática. Además, después de incorporarse a las células mientras está unido al anticuerpo, el antígeno se disocia del anticuerpo en el endosoma y después se degrada en el lisosoma, lo que da como resultado una disminución de la concentración de antígeno en el plasma en el organismo vivo. Cuando la actividad de unión al FcRn aumenta en unas condiciones de intervalo de pH ácido, la retención de anticuerpos en el plasma, incluso si empeora debido a una mayor actividad de unión al FcγR, mejora por un aumento en la velocidad de recirculación por el FcRn. En este caso, puesto que el antígeno unido al anticuerpo que se une al antígeno de manera dependiente del pH se disocia del anticuerpo en el endosoma y se degrada directamente en el lisosoma, no se cree que la concentración de antígeno aumente en el plasma. Además, se cree que la retención en el plasma mejorada del anticuerpo administrado al organismo vivo permite que se mantenga el efecto de eliminación de antígeno del anticuerpo y que la concentración de antígeno se mantenga baja durante un periodo más largo.

Los hallazgos anteriores demuestran que la retención plasmática de un anticuerpo administrado mejora en un organismo vivo al que se administra el anticuerpo en el que la actividad de unión al FcRn humano en unas condiciones de intervalo de pH ácido mejora en una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión a FcγR es mayor que la de la región Fc de IgG humana natural. Además, se puso de manifiesto que, en este caso, la retención de anticuerpos en el plasma mejora sin deteriorar el efecto de eliminación de antígeno.

Ejemplo 4. Evaluación adicional del efecto de la eliminación de antígenos de moléculas de unión al antígeno en el plasma cuya actividad de unión a FcγR es mayor que la de la región Fc de IgG humana natural y cuya actividad de unión al FcRn humano ha aumentado en unas condiciones de intervalo de pH ácido

(4-1) El efecto de eliminación de antígenos de un anticuerpo cuya actividad de unión a FcγR se aumenta

Como se describe en el ejemplo 2, la concentración de antígeno en el plasma se redujo significativamente en el grupo al que se administraba Fv4-IgG1-F1022 con unión a FcγR de ratón mejorada. Por otro lado, como se muestra en el ejemplo 3, la retención plasmática reducida observada en el grupo al que se administraba Fv4-IgG1-F1022 mejoró notablemente al aumentar la actividad de unión al FcRn humano de Fv4-IgG1-F1022 en unas condiciones de intervalo de pH ácido. A continuación, el efecto de eliminación de antígenos solubles del plasma mediante la mejora de la unión a FcγR de ratón y el efecto de mejora de la retención plasmática de un anticuerpo mediante la mejora de la actividad de unión a FcRn humano en unas condiciones de intervalo de pH ácido se evaluaron adicionalmente como se describe a continuación.

(4-2) Preparación de un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano con unión a FcγR de ratón mejorada

Se prepararon VH3-IgG1-F1087 (SEQ ID NO: 44) que resulta de sustituir Asp por Lys en la posición 326 (numeración EU) en VH3-IgG1, y VH3-IgG1-F1182 (SEQ ID NO: 45) que resulta de sustituir Asp por Ser en la posición 239 e Ile por Glu en la posición 332 (numeración EU) en VH3-IgG1, como moléculas de unión al antígeno con unión a FcγR de ratón mejorada. Fv4-IgG1-F1087 que contiene VH3-IgG1-F1087 como cadena pesada y VL3-CK como cadena ligera, y Fv4-IgG1-F1182 que contiene VH3-IgG1-F1182 como cadena pesada y VL3-CK como cadena ligera, se produjeron usando el método descrito en el ejemplo de referencia 1.

(4-3) Evaluación de la actividad de unión a FcγR de ratón

Se prepararon VH3/L (WT)-IgG1-F1087 y VH3/L (WT)-IgG1-F1182 que contienen VH3-IgG1-F1087 y VH3-IgG1-F1182 como la cadena pesada, respectivamente, y L (WT)-CK (SEQ ID NO: 42) como la cadena ligera, por el método descrito en el ejemplo de referencia 1. Estos anticuerpos y VH3/L (WT)-IgG1-F1022 y VH3/L (WT)-IgG1 se evaluaron para determinar su actividad de unión a FcγR de ratón por el método descrito en el ejemplo de referencia 2. El resultado se muestra en la Tabla 7. Además, la proporción del aumento en la actividad de unión a FcγR de ratón de cada variante con respecto a la IgG1 antes de la alteración se muestra en la Tabla 8. En la tabla VH3/L (WT)-IgG1, VH3/L (WT)-IgG1-F1022, VH3/L (WT)-IgG1-F1087, y VH3/L (WT)-IgG1-F1182 se muestran como IgG1, F1022, F1087, y F1182, respectivamente.

Tabla 7

Nombre de variante	KD (M)			
	mFc γ RI	mFc γ RIIfb	mFc γ RIIf	mFc γ RIIV
IgG1	5.3E-08	9.8E-07	2.4E-06	8.6E-08
F1022	7.6E-09	1.0E-08	5.5E-09	1.4E-07
F1087	2.9E-08	5.6E-08	5.2E-08	3.3E-07
F1182	2.4E-09	1.1E-07	4.8E-07	5.3E-10

Tabla 8

Nombre de variante	Relación de unión a IgG1			
	mFc γ RI	mFc γ RIIfb	mFc γ RIIf	mFc γ RIIV
IgG1	1.0	1.0	1.0	1.0
F1022	7.0	93.6	440.5	0.6
F1087	1.8	17.5	46.2	0.3
F1182	22.1	9.1	5.0	162.3

Como se muestra en la tabla 8, se demostró que F1087 y F1022 tenían una mayor actividad de unión a FcγRI de ratón, FcγRIIfb de ratón y FcγRIIf de ratón en comparación con IgG1, mientras que su actividad de unión a FcγRIIV de ratón no aumentaba. Con respecto a la actividad de unión de F1087 a FcγRI de ratón, FcγRIIfb de ratón, FcγRIIf de ratón y FcγRIIV de ratón, se puso de manifiesto que la extensión de su aumento era menor que la de F1022. Por otro lado, se mostró que la actividad de unión de F1182 a FcγRI de ratón y FcγRIIV de ratón aumentaba considerablemente, mientras que la extensión de aumento de su actividad de unión a FcγRIIfb y FcγRIIf era menor que la de F1022 y F1087. Como se ha mencionado antes, estos tres tipos de variantes mostraban una unión mejorada a algunos FcγR de ratón; sin embargo, se mostró que el FcγR al que la actividad de unión está selectivamente aumentada y la extensión del aumento varían dependiendo de la variante.

(4-4) El efecto de eliminación de antígenos del plasma de Fv4-IgG1-F1087 y Fv4-IgG1-F1182

Mediante el mismo método que se describe en el ejemplo 2, se llevaron a cabo ensayos de infusión in vivo usando ratones transgénicos con FcRn humano para determinar las concentraciones de receptores de IL-6 solubles en el plasma de los ratones. El resultado se muestra en la fig. 6.

En ambos grupos a los que se administró Fv4-IgG1-F1087 y Fv4-IgG1-F1182 in vivo, que tienen mayor actividad de unión a FcγR de ratón en comparación con Fv4-IgG1, la concentración plasmática in vivo del receptor de IL-6 humano soluble se podía reducir en comparación con el grupo al que se administraba Fv4-IgG1. El efecto para reducir la concentración plasmática de receptor de IL-6 humano soluble era alto, especialmente en el grupo al que se administraba Fv4-IgG1-F1087 que tiene mejor unión a FcγRIIf de ratón y FcγRIIf de ratón. Por otro lado, el efecto de la administración de F1182 para reducir la concentración plasmática de receptor de IL-6 humano soluble era pequeño en el grupo al que se administraba F1182 in vivo que tiene actividad de unión considerablemente aumentada al FcγRI

de ratón y FcγRIV de ratón (así como una unión mejorada varias veces al FcγRII de ratón y FcγRIII de ratón). A partir de estos resultados se pensó que los FcγR de ratón que contribuyen más significativamente por un efecto que disminuye eficazmente la concentración de antígeno en el plasma de ratones administrados con un anticuerpo de unión al antígeno dependiente del pH, son FcγRII de ratón y/o FcγRIII de ratón. Específicamente, se cree que la concentración de antígeno plasmático se puede reducir más eficazmente in vivo administrando a un organismo vivo un anticuerpo de unión al antígeno dependiente del pH con una unión mejorada a FcγRII de ratón y/o FcγRIII de ratón.

(4-5) Preparación de moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a FcγR es mayor que la actividad de unión de la región Fc de IgG humana natural y que han aumentado la actividad de unión al FcRn humano en unas condiciones de intervalo de pH ácido

Como se describe en el Ejemplo 3, cuando se compara con ratones transgénicos con FcRn humano a los que se administró Fv4-IgG1-F1022, la retención plasmática de un anticuerpo mejora notablemente en ratones transgénicos con FcRn humano a los que se administró Fv4-IgG1-F1093 como resultado del aumento de la actividad de unión a FcRn humano en unas condiciones de intervalo de pH ácido de Fv4-IgG1-F1022 en el que se ha aumentado la actividad de unión a FcγR de ratón. Si este efecto también se observa en ratones transgénicos con FcRn humano a los que se administró Fv4-IgG1-F1087 y Fv4-IgG1-F1182, y si se observa el mismo efecto en ratones a los que se administraron variantes cuya actividad de unión al FcRn humano se ha aumentado en unas condiciones de intervalo de pH ácido por adición de una alteración distinta de la alteración evaluada en el ejemplo 3 se evaluó como sigue.

Se prepararon VH3-IgG1-F1180 (SEQ ID NO: 46) y VH3-IgG1-F1181 (SEQ ID NO: 47) sustituyendo Met por Leu en la posición 428 y Asn por Ser en la posición 434 (numeración EU) en las cadenas pesadas VH3-IgG1-F1087 y VH3-IgG1-F1182, con el fin de aumentar su actividad de unión al FcRn humano de Fv4-IgG1-F1087 y Fv4-IgG1-F1182 en condiciones de intervalo de pH ácido. Además, se preparó VH3-IgG1-F1412 (SEQ ID NO: 48) sustituyendo Asn por Ala en la posición 434 (numeración EU) en la cadena pesada VH3-IgG1-F1087, con el fin de aumentar la actividad de unión al FcRn humano de Fv4-IgG1-F1087 en unas condiciones de intervalo de pH ácido. Fv4-IgG1-F1180, Fv4-IgG1-F1181 y Fv4-IgG1-F1412, que contienen las cadenas pesadas anteriores y VL3-CK como la cadena ligera, se prepararon usando el método descrito en el ejemplo de referencia 1.

(4-6) Mejora de la farmacodinámica de los anticuerpos aumentando la actividad de unión al FcRn humano en unas condiciones de intervalo de pH ácido

Los ensayos de infusión in vivo se llevaron a cabo administrando Fv4-IgG1-F1180, Fv4-IgG1-F1181 y Fv4-IgG1-F1412 a ratones transgénicos con FcRn humano de acuerdo con el mismo método que se describe en el ejemplo 2 para determinar las concentraciones de receptores de IL-6 solubles en el plasma de los ratones. Los resultados sobre las concentraciones de receptores de IL-6 solubles en el plasma de los grupos de ratones a los que se administró Fv4-IgG1-F1087, Fv4-IgG1-F1180, Fv4-IgG1-F1412 y Fv4-IgG1 se muestran en la Fig. 9. Los resultados sobre las concentraciones de receptores de IL-6 solubles en el plasma de los grupos de ratones a los que se administró Fv4-IgG1-F1182, Fv4-IgG1-F1181 y Fv4-IgG1 se muestran en la Fig. 10. Por otro lado, las concentraciones de anticuerpos en el plasma en los grupos de ratones se midieron por el método descrito en el ejemplo 3. Los resultados sobre las concentraciones de anticuerpos en el plasma de Fv4-IgG1-F1087, Fv4-IgG1-F1180, Fv4-IgG1-F1412 y Fv4-IgG1 en los grupos de ratones se muestran en la Fig. 7; y los resultados sobre las concentraciones de anticuerpos en el plasma de Fv4-IgG1-F1182, Fv4-IgG1-F1181 y Fv4-IgG1 se muestran en la Fig. 8.

Se confirmó que, en comparación con el grupo de ratones a los que se administró Fv4-IgG1-F1182, la retención plasmática de anticuerpos mejoró en el grupo de ratones a los que se administró Fv4-IgG1-F1181 como resultado del aumento de la actividad de unión al FcRn humano de Fv4-IgG1-F1182 en un intervalo de pH ácido. Por otro lado, la concentración de receptor de IL-6 soluble en el plasma de los grupos de ratones a los que se administró Fv4-IgG1-F1181 era comparable a la del grupo de ratones a los que se administró Fv4-IgG1-F1182. Cuando se comparaba con los grupos de ratones a los que se administró Fv4-IgG1, la concentración de receptor de IL-6 soluble en el plasma disminuyó en ambos grupos.

Por otro lado, en comparación con el grupo de ratones a los que se administró Fv4-IgG1-F1087, la retención plasmática de anticuerpos mejoró en ambos grupos de ratones a los que se administró Fv4-IgG1-F1180 y Fv4-IgG1-F1412 como resultado del aumento de la actividad de unión al FcRn humano de Fv4-IgG1-F1087 en un intervalo de pH ácido, y sorprendentemente, la retención plasmática mejoró hasta un nivel comparable al de los grupos de ratones a los que se administró Fv4-IgG1. Además, la sostenibilidad del efecto de reducir la concentración de receptor de IL-6 soluble en el plasma se mejoró por la mejora de la retención de anticuerpos en el plasma en los grupos de ratones a los que se administró. Específicamente, en los grupos de ratones a los que se administró, las concentraciones de receptores de IL-6 solubles en el plasma 14 días y 21 días después de la administración de Fv4-IgG1-F1180 y Fv4-IgG1-F1412 se redujeron significativamente en comparación con las concentraciones 14 días y 21 días después de la administración de Fv4-IgG1-F1087.

En vista de lo anterior, en cuanto a los grupos de ratones a los que se administraron los cuatro ejemplos de anticuerpos, Fv4-IgG1-F1093, Fv4-IgG1-F1181, Fv4-IgG1-F1180 y Fv4-IgG1-F1412, se demostró que la retención plasmática se puede mejorar en un organismo vivo al que se administraba un anticuerpo en el que la actividad de unión al FcRn humano en unas condiciones de intervalo de pH ácido se ha mejorado en una molécula de unión al antígeno cuya

actividad de unión al FcγR es mayor que la actividad de unión de la región Fc de la IgG humana natural. También se demostró que, en el organismo vivo al que se administraba la molécula de unión al antígeno, se mejora la retención plasmática sin deteriorar el efecto de eliminar antígenos del organismo vivo, y más bien, el efecto de eliminación de antígeno puede ser sostenido.

- 5 Se demuestra que la alteración para mejorar la actividad de unión al FcRn humano en unas condiciones de intervalo de pH ácido podría lograrse mediante el método que sustituye Asn por Ala en la posición 434 (numeración EU), además del método que sustituye Met por Leu en la posición 428 (numeración de la UE) y Asn por Ser en la posición 434 (numeración EU). Por lo tanto, las alteraciones usadas para mejorar la actividad de unión al FcRn humano en unas condiciones de intervalo de pH ácido no están particularmente limitadas, y se puede usar el método que sustituye
- 10 Met por Leu en la posición 428 (numeración EU) y Asn por Ser en la posición 434 (numeración EU) en un anticuerpo IgG (*Nat. Biotechnol.* (2010) 28, 157-159), el método que sustituye Asn por Ala en la posición 434 (numeración EU) en un anticuerpo IgG (*Drug Metab. Dispos.* (2010) 38 (4), 600-605), el método que sustituye Met por Tyr en la posición 252 (numeración EU), Ser por Thr en la posición 254 (numeración EU) y Thr por Glu en la posición 256 (numeración EU) en un anticuerpo IgG (*J. Biol. Chem* (2006) 281, 23514-23524), el método que sustituye Thr por Gln en la posición
- 15 250 (numeración EU) y Met por Leu en la posición 428 (numeración EU) en un anticuerpo IgG (*J. Immunol.* (2006) 176 (1), 346-356), el método que sustituye Asn por His en la posición 434 (numeración EU) en un anticuerpo IgG (*Clin. Pharmacol Ther.* (2011) 89 (2), 283-290), así como las alteraciones descritas en los documentos WO 2010/106180, WO 2010/045193, WO 2009/058492, WO 2008/022152, WO 2006/050166, WO 2006/053301, WO 2006/031370, WO 2005/123780, WO 2005/047327, WO 2005/037867, WO 2004/035752, WO 2002/060919 y similares.

- 20 (4-7) Preparación de moléculas de unión al antígeno con actividad de unión al FcRn humano aumentada en unas condiciones de intervalo de pH ácido y supresión de la unión a un factor reumatoide

En los últimos años, se ha descrito una molécula de anticuerpo que resulta de sustituir Asn por His en la posición 434 (numeración EU) en un anticuerpo anti-CD4 humanizado para mejorar la retención plasmática al aumentar su actividad de unión al FcRn humano en unas condiciones de intervalo de pH ácido, para unirse al factor reumatoide (RF) (*Clin. Pharmacol. Ther.* (2011) 89 (2), 283-290). Este anticuerpo tiene una región Fc de IgG1 humana y una sustitución de

25 Asn por His en la posición 434 (numeración EU) en el sitio de unión al FcRn. Se ha demostrado que el factor reumatoide reconoce y se une a la parte sustituida.

Como se muestra en (4-6), se han descrito diferentes alteraciones como alteraciones para mejorar la actividad de unión al FcRn humano en unas condiciones de intervalo de pH ácido, y la introducción de estas alteraciones en el sitio de unión al FcRn en una región Fc puede mejorar su afinidad por un factor reumatoide que reconoce este sitio.

30

Sin embargo, las moléculas de unión al antígeno que tienen actividad de unión al FcRn humano aumentada en unas condiciones de intervalo de pH ácido pero que no tienen la unión al factor reumatoide se pueden producir introduciendo en el sitio de la región Fc una alteración que reduce la actividad de unión al factor reumatoide solo sin reducir la actividad de unión al FcRn en unas condiciones de intervalo de pH ácido.

- 35 Dichas alteraciones usadas para reducir la actividad de unión al factor reumatoide incluyen alteraciones en las posiciones 248-257, 305-314, 342-352, 380-386, 388, 414-421, 423, 425-437, 439 y 441-444 (numeración EU), preferiblemente las de las posiciones 387, 422, 424, 426, 433, 436, 438 y 440 (numeración EU), y en particular preferiblemente, una alteración que sustituye Val por Glu o Ser en la posición 422, una alteración que sustituye Ser por Arg en la posición 424, una alteración que sustituye His por Asp en la posición 433, una alteración que sustituye
- 40 Tyr por Thr en la posición 436, una alteración que sustituye Gln por Arg o Lys en la posición 438, y una alteración que sustituye Ser por Glu o Asp en la posición 440 (numeración EU). Estas alteraciones se pueden usar solas o en combinación.

Alternativamente, se pueden introducir secuencias de glicosilación de tipo N para reducir la actividad de unión al factor reumatoide. Específicamente, las secuencias de glicosilación de tipo N conocidas incluyen Asn-Xxx-Ser/Thr (Xxx representa un aminoácido arbitrario distinto de Pro). Esta secuencia se puede introducir en la región Fc para añadir una cadena de azúcar de tipo N, y la unión al RF se puede inhibir por el impedimento estérico de la cadena de azúcar de tipo N. Las alteraciones usadas para añadir una cadena de azúcar de tipo N incluyen preferiblemente una alteración que sustituye Lys por Asn en la posición 248, una alteración que sustituye Ser por Asn en la posición 424, una alteración que sustituye Tyr por Asn en la posición 436 y Gln por Thr en la posición 438, y una alteración que sustituye

45 Qln por Asn en la posición 438, de acuerdo con la numeración EU, en particular preferiblemente una alteración que sustituye Ser por Asn en la posición 424 (numeración EU).

50

Ejemplo 5. Efecto de la eliminación de antígeno del plasma a partir de moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al FcγR es mayor que la de una región Fc de IgG de ratón natural

(5-1) Efecto de eliminación de antígeno de anticuerpos de ratón con actividad de unión al FcγR mejorada

- 55 Como se describe en los ejemplos 1 a 4, se demostró que la eliminación del receptor de IL-6 humano soluble del plasma de ratón se acelera en los grupos de ratones transgénicos con FcRn humano a los que se administró moléculas de unión al antígeno como resultado del aumento de la actividad de unión al FcγR de ratón de moléculas de unión al antígeno que tienen una región Fc de anticuerpo humano y la propiedad de unirse al receptor de IL-6 humano de una

manera dependiente del pH. Se evaluó si este efecto también se logra en ratones normales que tienen FcRn de ratón a los que se administró moléculas de unión al antígeno que tienen una región Fc de anticuerpo de ratón y la propiedad de unirse al receptor de IL-6 humano de manera dependiente del pH, en ratones normales que tienen FcRn de ratón de la siguiente manera.

5 (5-2) Preparación de anticuerpos de ratón con mayor actividad de unión a FcγR

Para un anticuerpo IgG1 de ratón que tiene la propiedad de unirse al receptor de IL-6 humano de manera dependiente del pH, se construyeron la cadena pesada VH3-mIgG1 (SEQ ID NO: 49) y la cadena ligera VL3-mk1 (SEQ ID NO: 50) usando el método descrito en el ejemplo de referencia 1. Por otro lado, para aumentar la actividad de unión al FcγR de ratón de VH3-mIgG1, se produjo VH3-mIgG1-mF44 (SEQ ID NO: 51) sustituyendo Ala por Asp en la posición 327 (numeración EU). Del mismo modo, VH3-mIgG1-mF46 (SEQ ID NO: 52) se produjo sustituyendo Ser por Asp en la posición 239 y Ala por Asp en la posición 327, según la numeración EU, en VH3-mIgG1. Fv4-mIgG1, Fv4-mIgG1-mF44 y Fv4-mIgG1-mF46, que contienen VH3-mIgG1, VH3-mIgG1-mF44 y VH3-mIgG1-mF46, respectivamente, como cadena pesada y VL3-mk1 como cadena ligera, se prepararon usando el método descrito en el ejemplo de referencia 1.

15 (5-3) Evaluación de la actividad de unión a FcγR de ratón

Se prepararon VH3/L (WT)-mIgG1, VH3/L (WT)-mIgG1-mF44 y VH3/L (WT)-mIgG1-mF46, que contienen VH3-mIgG1, VH3-mIgG1-mF44 y VH3-mIgG1-mF46, respectivamente, como cadena pesada, y L (WT)-CK (SEQ ID NO: 42) como cadena ligera, por el método descrito en el Ejemplo de referencia 1. Se evaluó la actividad de unión a FcγR de ratón de estos anticuerpos mediante el método descrito en el ejemplo de referencia 2. El resultado se muestra en la tabla 9. Además, la relación del aumento en la actividad de unión al FcγR de ratón de cada variante con respecto a mIgG1 antes de la alteración se muestra en la Tabla 10. En la tabla, VH3/L (WT)-mIgG1, VH3/L (WT)-mIgG1-mF44, y VH3/L (WT)-mIgG1-mF46 se muestran como mIgG1, mF44, y mF46, respectivamente.

Tabla 9

Nombre de variante	KD (M)			
	mFc y RI	mFc y RIIB	mFc y RIIL	mFc y RIV
mIgG1	No detectado	1.1E-07	2.1E-07	No detectado
mF44	No detectado	8.9E-09	6.7E-09	No detectado
mF46	No detectado	1.2E-09	3.6E-09	No detectado

25 Tabla 10

Nombre de variante	Relación de unión a mIgG1			
	mFc y RI	mFc y RIIB	mFc y RIIL	mFc y RIV
mIgG1	No detectado	1.0	1.0	No detectado
mF44	No detectado	11.9	31.0	No detectado
mF46	No detectado	91.4	57.5	No detectado

El resultado de la evaluación del ejemplo 4 que muestra que VH3/L (WT)-mIgG1 que tiene la región Fc del anticuerpo IgG1 de ratón natural solo se une a FcγRIIB de ratón y FcγRIIL de ratón pero no a FcγRI de ratón y FcγRIV de ratón, sugiere que los FcγR de ratón importantes para la reducción de concentración de antígeno son FcγRII de ratón y/o FcγRIIL de ratón. VH3/L (WT)-mIgG-mF44 y VH3/L (WT)-mIgG1-mF46 con una alteración introducida que se cree que aumenta la actividad de unión a FcγR de VH3/L (WT)-mIgG1 se demostró que tenían una mayor unión actividad tanto para FcγRIIB de ratón como para FcγRIIL de ratón.

(5-4) Evaluación del efecto para reducir la concentración de receptor de IL-6 soluble en el plasma de ratones normales

El efecto para eliminar el receptor de IL-6 soluble del plasma de ratones normales a los que se administró el anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano Fv4-mIgG1, Fv4-mIgG1-mF44 o Fv4-mIgG1-mF46 se evaluó de la siguiente manera.

Se creó un modelo animal donde la concentración de receptor de IL-6 humano soluble se mantiene en un estado estacionario en el plasma por implantación de una bomba de infusión (MINI-OSMOTIC PUMP MODEL2004, alzet) que contiene el receptor de IL-6 humano soluble, debajo de la piel en el lomo de ratones normales (ratón C57BL/6J, Charles River Japón). Se evaluó la dinámica in vivo del receptor de IL-6 humano soluble después de la administración del anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano en el modelo animal. Para suprimir la producción de anticuerpos contra el receptor de IL-6 humano soluble, se administró un anticuerpo monoclonal anti-CD4 de ratón una vez con 20 mg/kg en la vena caudal. Después, se implantó por vía subcutánea una bomba de infusión que contenía 92.8 µg/ml de receptor

de IL-6 humano soluble en el lomo de los ratones. Tres días después de la implantación de la bomba de infusión, el anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano se administró una vez con 1 mg/kg en la vena caudal. Se recogió la sangre de los ratones 15 minutos, siete horas, un día, dos días, cuatro días, siete días, 14 días (o 15 días) y 21 días (o 22 días) después de la administración del anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano. Inmediatamente después, la sangre recogida se centrifugó a 15.000 rpm y 4°C durante 15 minutos para preparar el plasma. El plasma aislado se almacenó en un congelador a -20°C o menos hasta su uso.

Las concentraciones de receptor de IL-6 humano soluble en el plasma se determinaron por el método descrito en (2-1-2). El resultado se muestra en la fig. 11.

Sorprendentemente, se demostró que, en ratones a los que se administró mF44 y mF46 con una alteración introducida para aumentar la actividad de unión de mlgG1 (IgG1 de ratón natural) a FcγRIIb de ratón y FcγRIII de ratón, la concentración de receptor de IL-6 en el plasma se redujo notablemente en comparación con ratones a los que se administró mlgG1. En particular, incluso el día 21 después de la administración de mF44, la concentración de receptor de IL-6 en el plasma en el grupo al que se administraba mF44 se redujo aproximadamente 6 veces en comparación con la concentración de receptor de IL-6 en el plasma en el grupo sin administración de anticuerpo, y aproximadamente 10 veces en comparación con el grupo al que se administraba mlgG1. Por otro lado, el día siete después de la administración de mF46, la concentración de receptor de IL-6 en el plasma en el grupo al que se administraba mF46 se redujo notablemente en aproximadamente 30 veces en comparación con la concentración de receptor de IL-6 en el plasma en el grupo sin administración de anticuerpos, y aproximadamente 50 veces en comparación con el grupo al que se administraba mlgG1.

Los hallazgos anteriores demuestran que la eliminación del receptor de IL-6 soluble del plasma también se aceleraba en ratones a los que se administraron anticuerpos en los que la actividad de unión a FcγR de ratón de una molécula de unión al antígeno que tiene las regiones Fc del anticuerpo IgG1 de ratón es mayor, como con anticuerpos en los que es mayor la actividad de unión a FcγR de ratón de una molécula de unión al antígeno que tiene la región Fc del anticuerpo IgG1 humano. Sin estar limitado por una teoría particular, el fenómeno observado como se ha descrito antes se puede explicar de la siguiente manera.

Cuando se administraban a ratones, los anticuerpos que se unen a un antígeno soluble de manera dependiente del pH y tienen una mayor actividad de unión a FcγR se incorporan activamente principalmente en las células que expresan FcγR en la membrana celular. Los anticuerpos incorporados disocian el antígeno soluble en unas condiciones de pH ácido en el endosoma, y después son recirculados al plasma por el FcRn. Por lo tanto, un factor que logra el efecto de eliminar el antígeno soluble del plasma de dicho anticuerpo es el nivel de actividad de unión al FcγR del anticuerpo. Específicamente, a medida que la actividad de unión al FcγR es mayor, la incorporación a las células que expresan FcγR se produce más activamente, y esto hace que la eliminación de antígenos solubles del plasma sea más rápida. Además, siempre que se haya incrementado la actividad de unión al FcγR, el efecto se puede evaluar de la misma manera independientemente de si la región Fc contenida en un anticuerpo procede de IgG1 humana o de ratón. Específicamente, la evaluación se puede lograr para una región Fc de cualquier especie animal, tal como cualquiera de IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana, IgG4 humana, IgG1 de ratón, IgG2a de ratón, IgG2b de ratón, IgG3 de ratón, IgG de rata, IgG de mono, e IgG de conejo, siempre que haya aumentado la actividad de unión al FcγR de la especie animal a la que se va a administrar.

Ejemplo 6. El efecto de eliminación de antígeno por anticuerpos en los que la actividad de unión al FcγRIIb se ha aumentado selectivamente

(6-1) El efecto de eliminación de antígeno de anticuerpos en los que la actividad de unión a FcγRIIb se ha aumentado selectivamente

Los ratones deficientes en FcγRIII (ratón B6.129P2-FcgrR3tm1Sjv/J, Jackson Laboratories) expresan FcγRI de ratón, FcγRIIb de ratón y FcγRIV de ratón, pero no FcγRIII de ratón. Mientras que los ratones deficientes en la cadena γ del receptor Fc (ratón Fcγ1g, Taconic, *Cell* (1994) 76, 519-529) expresan solo FcγRIIb de ratón, pero no FcγRI de ratón, FcγRIII de ratón y FcγRIV de ratón.

Como se describe en el ejemplo 5, se ha demostrado que mF44 y mF46 con actividad de unión a FcγR aumentada de IgG1 de ratón natural muestran una unión mejorada selectivamente a FcγRIIb de ratón y FcγRIII de ratón. Se concibió que, usando la actividad de unión aumentada selectivamente de los anticuerpos, las condiciones en las que se administra un anticuerpo con unión a FcγRIIb de ratón mejorada selectivamente se puede imitar administrando mF44 y mF46 a ratones deficientes en FcγRIII de ratón o ratones deficientes en cadena γ del receptor Fc que no expresan FcγRIII de ratón.

(6-2) Evaluación del efecto de eliminación de antígeno por mejora selectiva de la unión al FcγRIIb de ratón usando ratones deficientes en FcγRIII

El efecto para eliminar el receptor de IL-6 soluble del plasma en ratones deficientes en FcγRIII a los que se administró el anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano Fv4-mlgG1, Fv4-mlgG1-mF44 o Fv4-mlgG1-mF46 se evaluó por el mismo método descrito en el ejemplo 5. Las concentraciones de receptor de IL-6 humano soluble en el plasma de los ratones se determinaron por el método descrito en el ejemplo (2-1-2). El resultado se muestra en la fig. 12.

Sorprendentemente, se demostró que, las concentraciones plasmáticas del receptor de IL-6 en ratones deficientes en FcγRIII a los que se administró mF44 y mF46, que imitan las condiciones en las que se aumenta selectivamente la actividad de unión a FcγRIIb de ratón de mlgG1 (IgG1 de ratón natural), eran notablemente menores en comparación con la concentración de receptor de IL-6 en el plasma en ratones a los que se administró mlgG1. En particular, la concentración del receptor de IL-6 en el plasma del grupo al que se administraba mF44 se redujo aproximadamente tres veces en comparación con la del grupo al que se administraba mlgG1 y se suprimía la acumulación de concentración de anticuerpos debido a la administración de anticuerpos. Por otro lado, el día tres después de la administración, la concentración de receptor de IL-6 en el plasma del grupo al que se administraba mF46 se redujo notablemente en aproximadamente seis veces en comparación con la concentración del receptor de IL-6 en el plasma del grupo sin administración de anticuerpos, y aproximadamente 25 veces en comparación con la concentración del receptor de IL-6 en el plasma del grupo al que se administraba mlgG1. Este resultado muestra que, puesto que la actividad de unión a FcγRIIb de ratón de un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano que se une al antígeno de una manera dependiente del pH es mayor, la concentración del receptor de IL-6 se puede reducir más en el plasma de ratones a los que se administra el anticuerpo.

(6-3) Evaluación del efecto de eliminación de antígeno por mejora selectiva de la unión a FcγRIIb de ratón usando ratones deficientes en la cadena γ del receptor Fc

El efecto para eliminar el receptor de IL-6 soluble del plasma de los ratones deficientes en la cadena γ del receptor Fc a los que se administró el anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano Fv4-mlgG1, Fv4-mlgG1-mF44, o Fv4-mlgG1mF46, se evaluó por el mismo método que se describe en el ejemplo 5. Las concentraciones de receptor de IL-6 humano soluble en el plasma de los ratones se determinaron mediante el método descrito en el ejemplo (2-1-2). El resultado se muestra en la fig. 13.

Al igual que en el caso en que se administraron mF44 y mF46 a ratones deficientes en FcγRIII, se demostró que la concentración plasmática del receptor de IL-6 en ratones deficientes en la cadena γ del receptor Fc a los que se administró mF44 y mF46, que imitan las condiciones que resultan del aumento selectivo en la actividad de unión a FcγRIIb de ratón de mlgG1 (IgG1 de ratón natural), se reducía notablemente en comparación con la concentración de receptor de IL-6 en el plasma en ratones deficientes en la cadena γ del receptor Fc a los que se administró mlgG1. En particular, la concentración plasmática del receptor de IL-6 en el grupo al que se administraba mF44 se reducía a aproximadamente tres veces la del grupo al que se administraba mlgG1, y se suprimía la acumulación de concentración de antígeno debido a la administración de anticuerpo. Por otro lado, el día tres después de la administración, la concentración del receptor de IL-6 en el plasma en el grupo al que se administraba mF46 se redujo notablemente en aproximadamente cinco veces en comparación con la del grupo sin administración de anticuerpo, y aproximadamente 15 veces en comparación con la del grupo al que se administraba mlgG1.

Los resultados descritos en los ejemplos (6-2) y (6-3) muestran que la concentración de antígeno soluble en el plasma se reduce notablemente en el grupo al que se administra un anticuerpo que se une a un antígeno soluble de manera dependiente del pH y tiene actividad de unión a FcγRIIb de ratón aumentada selectivamente.

Ejemplo 7. El efecto de eliminación de antígeno de los anticuerpos con unión a FcγRIII selectivamente mejorada

(7-1) El efecto de eliminación de antígeno de los anticuerpos con unión a FcγRIII selectivamente mejorada

Ratones deficientes en FcγRIIb (ratón Fcgr2b (FcγRII), Taconic) (*Nature* (1996) 379 (6563), 346-349) expresan FcγRI de ratón, FcγRIII de ratón y FcγRIV de ratón, pero no FcγRIIb de ratón. Como se describe en el ejemplo 5, se demostró que mF44 y mF46 que resultan del aumento de la actividad de unión a FcγR de IgG1 de ratón natural muestran una unión selectivamente mejorada a FcγRIIb de ratón y FcγRIII de ratón. Se concibió que, basándose en el uso de la actividad de unión selectivamente aumentada de los anticuerpos, las condiciones de administración de un anticuerpo con unión selectivamente mejorada a FcγRIII de ratón se puede imitar administrando mF44 o mF46 a ratones deficientes en FcγRIIb de ratón que no exprese FcγRIIb de ratón.

Como se describe en el ejemplo 6, la concentración de antígeno soluble se reducía en el plasma de ratones deficientes en FcγRIII, que imita las condiciones de administración de un anticuerpo con actividad de unión a FcγRIIb de ratón selectivamente aumentada. Por otro lado, se evaluó si la concentración de antígeno soluble se reduce en el plasma de ratones deficientes en FcγRIIb, que imitan las condiciones de administración de un anticuerpo con actividad de unión a FcγRIII de ratón selectivamente aumentada, mediante la prueba descrita a continuación.

(7-2) Evaluación del efecto de eliminación de antígeno por mejora selectiva de la unión a FcγRIII de ratón usando ratones deficientes en FcγRIIb

El efecto para eliminar el receptor de IL-6 soluble del plasma de ratones deficientes en FcγRIIb a los que se administró el anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano Fv4-mlgG1, Fv4-mlgG1-mF44 o Fv4-mlgG1mF46, se evaluó por el mismo método que se describe en el ejemplo 5. Las concentraciones de receptor de IL-6 humano soluble en el plasma se determinaron por el método descrito en el ejemplo (2-1-2). El resultado se muestra en la fig. 14.

Sorprendentemente, en los grupos a los que se administró mF44 y mF46, que imita el aumento selectivo de la actividad de unión a FcγRIII de ratón de mlgG1 (IgG1 de ratón natural), la concentración plasmática de receptor de IL-6 se

reducía, pero la reducción notable no se confirmaba en comparación con lo mostrado en el ejemplo 6.

Sin estar limitados por una teoría particular, basándose en los resultados descritos en los ejemplos 5, 6 y 7, es posible la siguiente discusión. Se encontró que la eliminación del receptor de IL-6 soluble del plasma se aceleraba notablemente en ratones normales que expresaban tanto FcγRIIb de ratón como FcγRIII de ratón a los que se administró mF44 y mF46 con actividad de unión selectivamente incrementada de mIgG1 (IgG1 de ratón natural) a FcγRIIb de ratón y ratón FcγRIII. Además, se puso de manifiesto que, cuando se administraban mF44 y mF46 a ratones que expresan FcγRIIb de ratón pero no FcγRIII de ratón (es decir, ratones deficientes en FcγRIII y ratones deficientes en la cadena y del receptor Fc), la eliminación del receptor de IL-6 soluble del plasma también se aceleraba notablemente en los ratones. Mientras que cuando se administraban mF44 y mF46 a ratones que expresan FcγRIII de ratón pero no FcγRIIb de ratón (es decir, ratones deficientes en FcγRII), la eliminación del receptor de IL-6 soluble del plasma no se aceleraba de forma notable en los ratones.

A partir de los hallazgos anteriores, se cree que los anticuerpos mF44 y mF46 en los que aumenta la actividad de unión de mIgG1 (IgG1 de ratón natural) a FcγRIIb de ratón y FcγRIII de ratón, se incorporan en células que expresan FcγR principalmente por el FcγRIIb de ratón, y por lo tanto se elimina el antígeno soluble en el plasma que se une a los anticuerpos. Por otro lado, se cree que la incorporación mediada por FcγRIII de complejos de anticuerpo/antígeno en células que expresan FcγR no contribuye significativamente a la eliminación del antígeno soluble del plasma.

Además, como se muestra en el ejemplo 4, la concentración plasmática del receptor de IL-6 soluble se reducía notablemente en ratones a los que se administró Fv4-IgG1-F1087 que tiene una mayor actividad de unión a FcγRIIb de ratón y FcγRIII de ratón, en particular. Por otro lado, el efecto para eliminar el receptor de IL-6 soluble del plasma de ratones a los que se administró Fv4-IgG1-F1182 con mayor actividad de unión a FcγRI de ratón y FcγRIV de ratón, en particular, era menor que el de Fv4-IgG1-F1087.

Además, como se muestra en el ejemplo 2, en ratones a los que se administró Fv4-IgG1-Fuc cuya actividad de unión a FcγRIV de ratón ha aumentado considerablemente al tener cadenas de azúcar con bajo contenido de fucosa (*Science* (2005) 310 (5753), 1510-1512), la concentración plasmática del receptor de IL-6 soluble se reducía en comparación con la de ratones a los que se administró Fv4-IgG1; sin embargo, el efecto de reducción era tan pequeño como aproximadamente el doble. Por lo tanto, se cree que la incorporación de anticuerpos mediada por FcγRIV de ratón en células que expresan FcγR no contribuye significativamente a la eliminación de antígenos solubles en el plasma.

En vista de lo anterior, se demostró que, de varios FcγR de ratón, el FcγRIIb de ratón tiene una función importante en la incorporación de anticuerpos en células que expresan FcγR en ratones. Por lo tanto, se pensaría que las mutaciones que se van a introducir en el dominio de unión a FcγR de ratón incluyen en particular preferiblemente, pero no se limitan a, mutaciones que mejoran la unión a FcγRIIb de ratón.

Los hallazgos anteriores demuestran que, en ratones, la actividad de unión a FcγRIIb de los anticuerpos que se administran más preferiblemente se aumenta para acelerar la eliminación de antígenos solubles del plasma de un organismo vivo por administración de moléculas de unión al antígeno que se unen a antígenos solubles de una manera dependiente del pH y tienen mayor actividad de unión a FcγR. Específicamente, cuando se administran a un organismo vivo, las moléculas de unión al antígeno que se unen a antígenos solubles de una manera dependiente del pH y tienen una mayor actividad de unión a FcγRIIb pueden acelerar la eliminación de los antígenos solubles del plasma y reducir efectivamente la concentración plasmática de antígenos solubles y, por lo tanto, se puso de manifiesto que las moléculas de unión al antígeno mostraban una acción muy efectiva.

Ejemplo 8. Evaluación de la capacidad de agregación plaquetaria de anticuerpos que contienen una región Fc con una alteración existente introducida que mejora la unión a FcγRIIb

(8-1) Preparación de anticuerpos que contienen una región Fc con una alteración existente introducida que mejora la unión a FcγRIIb

Como se describe en el ejemplo 7, los antígenos se pueden eliminar eficazmente del plasma del organismo vivo por administración de anticuerpos con actividad de unión a FcγRIIb selectivamente aumentada al organismo vivo. Además, se cree que la administración de anticuerpos que contienen una región Fc con actividad de unión a FcγRIIb aumentada selectivamente es preferible desde el punto de vista de la seguridad y los efectos secundarios en el organismo vivo al que se administraron dichos anticuerpos.

Sin embargo, tanto la unión a FcγRIIb de ratón como la unión a FcγRIII de ratón están mejoradas en mF44 y mF46, y por lo tanto la mejora de la unión no es selectiva para FcγRIIb de ratón. Dado que la homología entre FcγRIIb de ratón y FcγRIII de ratón es alta, sería difícil encontrar una alteración que mejore la unión selectiva a FcγRIIb de ratón a la vez que se distinguen los dos. Además, no hay ningún informe previo sobre las regiones Fc con unión a FcγRIIb de ratón selectivamente mejorada. Además, también se sabe que la homología entre FcγRIIb humano y FcγRIIa humano (los dos alotipos, 131Arg y 131His) es alta. Además, no hay ninguna descripción de regiones Fc que contienen una alteración que mejora la unión selectiva a FcγRIIb humano a la vez que se distinguen las dos (Seung et al., *Mol. Immunol.* (2008) 45, 3926-3933; Greenwood y col., *Eur. J. Immunol.* (1993) 23 (5), 1098-1104)). Además, se ha descrito que los anticuerpos con unión a FcγRIIa mejorada tienen mayor actividad de agregación plaquetaria y pueden

aumentar el riesgo de desarrollar trombosis cuando se administran a organismos (Meyer et al. (*J. Thromb. Haemost.* (2009), 7 (1), 171-181) y Robles-Carrillo et al. (*J. Immunol.* (2010), 185 (3), 1577-1583)). Por lo tanto, se evaluó como sigue si los anticuerpos con unión a FcγRIIIa mejorada tienen una mayor actividad de agregación de plaquetas.

(8-2) Evaluación de la actividad de unión al FcγR humano de anticuerpos que contienen una región Fc con una alteración existente introducida que mejora la unión a FcγRIIb

Se analizó la afinidad de anticuerpos que contienen una región Fc con una alteración existente introducida que mejora la unión a FcγRIIb humano por FcγRIa, FcγRIIb tipo R y tipo H, FcγRIIb y FcγRIIIa humanos por el siguiente procedimiento. Se construyó una cadena H para tener, como la región variable de la cadena H del anticuerpo, la región variable del anticuerpo IL6R-H (SEQ ID NO: 53) contra el receptor de interleuquina 6 humano que se describe en el documento WO2009/125825, y como región constante de la cadena H del anticuerpo, IL6R-G1d (SEQ ID NO: 54) que tiene G1d que resulta de la eliminación de Gly y Lys C-terminales de la IgG1 humana. Después, se construyó IL6R-G1d-v3 (SEQ ID NO: 55) alterando la región Fc de IL6R-G1d por la sustitución de Ser por Glu en la posición 267 (numeración EU) y Leu por Phe en la posición 328 (numeración EU), como se describe en Seung et al., (*Mol. Immunol.* (2008) 45, 3926-3933). IL6R-L (SEQ ID NO: 56), que es la cadena L del anticuerpo anti-receptor de interleuquina 6 humano, se usó como una cadena L de anticuerpo común, y se expresó en combinación con las cadenas H respectivas de acuerdo con el método descrito en el ejemplo de referencia 1, y los anticuerpos resultantes se purificaron. En lo sucesivo, los anticuerpos que contienen IL6R-G1d e IL6R-G1d-v3 como la cadena pesada se denominan IgG1 e IgG1-v3, respectivamente.

Después, la interacción entre el FcγR y los anticuerpos anteriores se analizó cinéticamente usando Biacore T100 (GE Healthcare). El ensayo de la interacción se llevó a cabo a 25°C usando HBS-EP+ (GE Healthcare) como tampón de análisis. El chip usado era un Sencor Chip CM5 Serie S (GE Healthcare) inmovilizado con proteína A por un método de acoplamiento de amino. Se permitió que cada FcγR diluido con el tampón de análisis interaccionara con los anticuerpos de interés capturados sobre el chip para medir la unión de los anticuerpos a cada FcγR. Después de la medición, se hizo reaccionar glicina-HCl 10 mM (pH 1.5) en el chip para lavar los anticuerpos capturados para usar repetidamente el chip regenerado. Se analizó un sensorgrama obtenido como resultado de la medición usando el modelo de unión de Langmuir 1:1 con el software de evaluación de Biacore, y se calcularon la constante de velocidad de unión k_a (l/mol/s) y la constante de velocidad de disociación k_d (1/s), y se calculó la constante de disociación KD (mol/l) a partir de estos valores. Los valores de KD de IgG1 e IgG1-v3 para cada FcγR (los valores KD de cada anticuerpo para cada FcγR) se muestran en la Tabla 11, mientras que los valores de KD relativos de IgG1-v3, que se obtienen dividiendo KD de IgG1 para cada FcγR entre KD de IgG1-v3 para cada FcγR, se muestran en la Tabla 12.

Tabla 11

Anticuerpo	KD (M)				
	Fc γ RIa	Fc γ RIIRaR	Fc γ RIIRaH	Fc γ RIIRb	Fc γ RIIRIa
IgG1	3.4E-10	1.2E-06	7.7E-07	5.3E-06	3.1E-06
IgG1-v3	1.9E-10	2.3E-09	1.5E-06	1.3E-08	8.8E-06

Tabla 12

	Fc γ RIa	Fc γ RIIRaR	Fc γ RIIRaH	Fc γ RIIRb	Fc γ RIIRIa
Relación de valores de KD	1.8	522	0.51	408	0.35

Estos resultados confirmaban que en comparación con el anticuerpo que contiene la región Fc de IgG1, el anticuerpo que contiene una región Fc alterada en la que la Ser en la posición 267 se ha sido sustituido por Glu y la Leu en la posición 328 se ha sustituido por Phe, como lo indica la numeración EU, en la región Fc de IgG1 (*Mol. Immunol.* (2008) 45, 3926-3933), tiene una afinidad 408 veces mayor por FcγRIIb, y mientras que la afinidad por el FcγRIIIa tipo H se reducía a 0.51 veces, la afinidad por el FcγRIIIa tipo R aumentaba 522 veces.

(8-3) Evaluación de la capacidad de agregación de plaquetas

A continuación, se evaluó si la afinidad aumentada/reducida por FcγRIIIa del anticuerpo que contiene la región Fc con la sustitución de Ser por Glu en la posición 267 y Leu por Phe en la posición 328 (numeración UE) en la región Fc de IgG1 cambia la capacidad de agregación plaquetaria, usando plaquetas derivadas de donantes con FcγRIIIa tipo H o tipo R. Se construyó el anticuerpo que comprendía como la cadena ligera omalizumab_VL-CK (SEQ ID NO: 58) y omalizumab_VH-G1d (SEQ ID NO: 57) que contiene la región variable de la cadena pesada del anticuerpo hIgG1 (región constante de IgG1 humana) que se une a IgE y la región constante de la cadena pesada G1d, usando el método descrito en el ejemplo de referencia 1. Además, se construyó omalizumab_VH-G1d-v3 (SEQ ID NO: 59) sustituyendo Ser por Glu en la posición 267 y Leu por Phe en la posición 328 (numeración EU) en omalizumab_VH-G1d. Omalizumab-G1d-v3, que contiene omalizumab_VH-G1d-v3 como la cadena pesada y omalizumab_VL-CK

como la cadena ligera, se preparó usando el método descrito en el ejemplo de referencia 1. Se evaluó la capacidad de agregación plaquetaria de este anticuerpo.

La agregación de plaquetas se ensayó usando el agregómetro plaquetario HEMA TRACER 712 (LMS Co.). Primero, se recogieron aproximadamente 50 ml de sangre completa en una cantidad fija en tubos de recogida de sangre a los que se había extraído el aire de 4.5 ml que contenían 0.5 ml de citrato de sodio al 3.8%, y esto se centrifugó a 200 g durante 15 minutos. El líquido sobrenadante resultante se recogió y se usó como plasma rico en plaquetas (PRP). Después de lavar el PRP con tampón A (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaHCO₃ 12 mM, NaH₂PO₄ 0.42 mM, MgCl₂ 2 mM, HEPES 5 mM, dextrosa 5.55 mM, apirasa 1.5 U/ml, BSA al 0,35%), el tampón se reemplazó con tampón B (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaHCO₃ 12 mM, NaH₂PO₄ 0.42 mM, MgCl₂ 2 mM, HEPES 5 mM, dextrosa 5.55 mM, CaCl₂ 2 mM, BSA al 0,35%). Esto produjo plaquetas lavadas en una densidad de aproximadamente 300 000/μl. 156 μl de las plaquetas lavadas se dividieron en partes alícuotas en cubetas de ensayo que contenían una barra de agitación en el agregómetro plaquetario. Las plaquetas se agitaron a 1000 rpm con la barra de agitación en las cubetas mantenida a 37.0°C en el agregómetro plaquetario. Se añadieron a las cubetas 44 μl del complejo inmunitario de omalizumab-G1d-v3 e IgE en una relación molar de 1:1, preparado en concentraciones finales de 600 μg/ml y 686 μg/ml, respectivamente. Las plaquetas se hicieron reaccionar con el complejo inmunitario durante cinco minutos. Después, en una concentración que no permite la agregación plaquetaria secundaria, se añadió difosfato de adenosina (ADP, SIGMA) a la mezcla de reacción para probar si mejora la agregación.

El resultado de la agregación plaquetaria para cada donante con una forma polimórfica FcγRIIIa (H/H o R/H) obtenida del ensayo anterior se muestra en las Figs. 15 y 16. A partir del resultado en la Fig. 15, se muestra que la agregación plaquetaria mejora cuando se añade el complejo inmunitario a las plaquetas de un donante con la forma polimórfica FcγRIIIa (R/H). Por otro lado, como se muestra en la Fig. 16, la agregación plaquetaria no mejoraba cuando el complejo inmunitario se añade a las plaquetas de un donante con la forma polimórfica FcγRIIIa (H/H).

A continuación, se evaluó la activación plaquetaria usando marcadores de activación. La activación plaquetaria se puede medir basándose en el aumento de expresión de un marcador de activación tal como CD62p (p-selectina) o integrina activa en la superficie de la membrana plaquetaria. Se añadieron 2.3 μl del complejo inmunitario a 7.7 μl de las plaquetas lavadas preparadas por el método descrito antes. Después de cinco minutos de reacción a temperatura ambiente, se indujo la activación por adición de ADP a una concentración final de 30 μM, y se evaluó si el complejo inmunitario mejora la activación dependiente de ADP. Se usó una muestra con tampón fosfato añadido (pH 7.4) (Gibco), en lugar del complejo inmunitario, como control negativo. La tinción se llevó a cabo añadiendo, a cada muestra después de la reacción, el anticuerpo anti-CD62 marcado con PE (BECTON DICKINSON), el anticuerpo anti-CD61 marcado con PerCP y el anticuerpo PAC-1 marcado con FITC (BD bioscience). La intensidad de fluorescencia para cada tinción se midió usando un citómetro de flujo (FACS Cantoll, BD bioscience).

El resultado de la expresión de CD62p, obtenido por el método de ensayo anterior, se muestra en la Fig. 17. El resultado de la expresión de integrina activada se muestra en la Fig. 18. Las plaquetas lavadas usadas se obtuvieron de una persona sana con la forma polimórfica de FcγRIIIa R/H. Tanto CD62p como la integrina activa expresados en la superficie de la membrana plaquetaria, que es inducida por la estimulación con ADP, mejoraron en presencia del complejo inmunitario.

Los resultados anteriores demuestran que el anticuerpo que tiene la región Fc con una alteración existente introducida que mejora la unión a FcγRIIIb humano, que es la sustitución de Ser por Glu en la posición 267 y Leu por Phe en la posición 328 (numeración EU) en la región Fc de IgG1, promueve la agregación de plaquetas cuyo alotipo de FcγRIIIa es aquel en el que el aminoácido en la posición 131 es R, en comparación con las plaquetas cuyo alotipo de FcγRIIIa es aquel en el que el aminoácido en la posición 131 es H. Es decir, se sugirió que el riesgo de desarrollar trombosis debido a la agregación plaquetaria puede aumentar cuando un anticuerpo que contiene una región Fc con una alteración existente introducida que mejora la unión al FcγRIIIb humano existente se administra a seres humanos que tienen FcγRIIIa de tipo R. Se demostró que las moléculas de unión al antígeno que contienen una región Fc de la presente descripción que mejora la unión a FcγRIIIb de manera más selectiva no solo mejoran la retención de antígeno en el plasma, sino que también posiblemente resuelve los problemas anteriores. Por lo tanto, la utilidad de las moléculas de unión al antígeno de la presente descripción es obvia.

Ejemplo 9. Análisis exhaustivo de la unión a FcγRIIIb de variantes con una alteración introducida en la porción de bisagra además de la alteración P238D

En una Fc producida sustituyendo la Pro en la posición 238 (numeración EU) por Asp en una IgG1 humana natural, no se pudo obtener un efecto combinatorio anticipado incluso combinándolo con otra alteración que se prevé que aumente todavía más la unión a FcγRIIIb del análisis de anticuerpos naturales. Por lo tanto, con el fin de encontrar variantes que mejoren todavía más la unión a FcγRIIIb, se introdujeron alteraciones de manera exhaustiva en el Fc alterado producido por sustitución de Pro en la posición 238 (numeración EU) por Asp. IL6R-F11 (SEQ ID NO: 60) se produjo introduciendo una alteración de sustitución de Met en la posición 252 (numeración EU) por Tyr y una alteración de sustitución de Asn en la posición 434 (numeración EU) por Tyr en IL6R-G1d (SEQ ID NO: 54) que se usó como la cadena H de anticuerpo. Además, IL6R-F652 (SEQ ID NO: 61) se preparó introduciendo una alteración de sustitución de Pro en la posición 238 (numeración EU) por Asp en IL6R-F11. Se prepararon plásmidos de expresión que contenían una secuencia de cadena H de anticuerpo para cada una de las secuencias de cadena H de anticuerpo producidas

sustituyendo la región cerca del resto en la posición 238 (numeración EU) (posiciones 234 a 237 y 239 (numeración EU)) en IL6R-F652 cada uno con 18 aminoácidos excluyendo los aminoácidos originales y la cisteína. Se usó IL6R-L (SEQ ID NO: 56) como una cadena L de anticuerpo. Estas variantes se expresaron y purificaron por el método del ejemplo de referencia 1. Estas variantes de Fc se llaman variantes PD. Las interacciones de cada variante PD con FcγRIIa tipo R y FcγRIIb se evaluaron exhaustivamente por el método del ejemplo de referencia 2.

Se produjo una figura que muestra los resultados del análisis de la interacción con los respectivos FcγR de acuerdo con el siguiente método. El valor obtenido dividiendo el valor de la cantidad de unión de cada variante PD a cada FcγR entre el valor de la cantidad de unión de FcγR del anticuerpo prealterado que se usa como control (IL6R-F652/IL6R-L, que tiene una alteración de sustitución de Pro en la posición 238 (numeración EU) por Asp y después multiplicando el resultado por 100, se mostró como el valor de actividad de unión relativa de cada variante PD a cada FcγR. El eje horizontal muestra los valores relativos de la actividad de unión a FcγRIIb de cada variante PD, y el eje vertical muestra valores relativos de los valores de actividad de unión a FcγRIIa tipo R de cada variante PD (Fig. 19).

Como resultado, se encontró que la unión a FcγRIIb de once tipos de alteraciones mejoraba en comparación con el anticuerpo antes de introducir alteraciones, y tienen los efectos de mantener o mejorar la unión a FcγRIIa tipo R. Las actividades de estas once variantes para unir FcγRIIb y FcγRIIa R se resumen en la Tabla 13. En la tabla, los números de ID de secuencia se refieren a los de las cadenas H de las variantes, y la alteración se refiere a la alteración introducida en IL6R-F11 (SEQ ID NO: 60).

Tabla 13

Nombre de la variante	Alteración	Actividad de unión relativa a FcγRIIb	Actividad de unión relativa a FcγRIIaR
IL6R-F652/IL6R-L	P238D	100	100
IL6R-PD042/IL6R-L	P238D/L234W	106	240
IL6R-PD043/IL6R-L	P238D/L234Y	112	175
IL6R-PD079/IL6R-L	P238D/G237A	101	138
IL6R-PD080/IL6R-L	P238D/G237D	127	222
IL6R-PD081/IL6R-L	P238D/G237E	101	117
IL6R-PD082/IL6R-L	P238D/G237F	108	380
IL6R-PD086/IL6R-L	P238D/G237L	112	268
IL6R-PD087/IL6R-L	P238D/G237M	109	196
IL6R-PD094/IL6R-L	P238D/G237W	122	593
IL6R-PD095/IL6R-L	P238D/G237Y	124	543
IL6R-PD097/IL6R-L	P238D/S239D	139	844

La figura 20 muestra los valores relativos para la actividad de unión a FcγRIIb obtenida por introducción adicional de las once alteraciones anteriores en una variante que lleva la alteración P238D, y los valores relativos para la actividad de unión a FcγRIIb de una variante obtenida introduciendo las alteraciones en una Fc que no contiene P238D. Estas once alteraciones mejoraron la cantidad de unión a FcγRIIb en comparación con antes de la introducción cuando se introdujeron adicionalmente a la variante P238D. Por el contrario, se observó el efecto de disminución de la unión a FcγRIIb para ocho de esas alteraciones, excepto G237F, G237W y S239D, cuando se introdujeron en la variante que no contiene P238D (datos no mostrados).

Estos resultados mostraban que, basándose en los efectos de la introducción de alteraciones en una IgG1 natural, es difícil predecir los efectos de combinar e introducir las mismas alteraciones en la variante que contiene la alteración P238D. En otras palabras, no habría sido posible descubrir estas ocho alteraciones identificadas esta vez sin esta investigación que introduce las mismas alteraciones que se combinan e introducen en la variante que contiene la alteración P238D.

Los resultados de la medición de los valores de KD de las variantes indicadas en la Tabla 13 para FcγRIa, FcγRIIaR, FcγRIIaH, FcγRIIb y FcγRIIIaV por el método del ejemplo de referencia 2 se resumen en la Tabla 14. En la tabla, la alteración se refiere a la alteración introducida en IL6R-F11 (SEQ ID NO: 60). El molde usado para producir IL6R-F11, IL6R-G1d/IL6R-L, se indica con un asterisco (*). Además, KD (IIaR)/KD (IIb) y KD (IIaH)/KD (IIb) en la tabla muestran respectivamente el valor obtenido dividiendo el valor de KD de cada variante para FcγRIIaR entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb, y el valor obtenido dividiendo el valor de KD de cada variante para FcγRIIaH entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb. KD (IIb) del polipéptido original/KD (IIb) de la variante se refiere a un valor obtenido dividiendo el valor de KD del polipéptido original para FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb. Además, la Tabla 14 muestra los valores de KD para la más fuerte de las actividades de unión a FcγRIIaR y

FcyRIIaH de cada variante/valores de KD para la más fuerte de las actividades de unión a FcyRIIaR y FcyRIIaH del polipéptido original. En la presente memoria, el polipéptido original se refiere a una variante que tiene IL6R-F11 (SEQ ID NO: 60) como la cadena H. Se determinó que debido a la débil unión de FcyR a la IgG, era imposible analizar con precisión por análisis cinético y, por lo tanto, las celdas rellenas de gris en la Tabla 14 muestran valores calculados usando la ecuación 2 del ejemplo de referencia 2.

Ecuación 2

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

La Tabla 14 muestra que todas las variantes mejoraron su afinidad por FcyRIIb en comparación con IL6R-F11, y el intervalo de mejora fue de 1.9 veces a 5.0 veces. La relación del valor de KD de cada variante para FcyRIIaR/valor de KD de cada variante para FcyRIIb, y la relación del valor de KD de cada variante para FcyRIIaH/KD de cada variante para FcyRIIb representan una actividad de unión a FcyRIIb en relación con la actividad de unión a FcyRIIaR y la actividad de unión a FcyRIIaH, respectivamente. Es decir, estos valores muestran el grado de selectividad de unión de cada variante para FcyRIIb, y un valor mayor indica una mayor selectividad de unión para FcyRIIb. Para el polipéptido original IL6R-F11/IL6R-L, la relación del valor de KD para FcyRIIaR/valor de KD para FcyRIIb y la relación del valor de KD para FcyRIIaH/valor de KD para FcyRIIb son 0.7 y, en consecuencia, todas las variantes en la Tabla 14 mostraron mejora de la selectividad de unión para FcyRIIb en comparación con el polipéptido original. Cuando el valor de KD para la más fuerte de las actividades de unión a FcyRIIaR y FcyRIIaH de una variante/valor de KD para la más fuerte de las actividades de unión a FcyRIIaR y FcyRIIaH del polipéptido original es 1 o más, esto significa que la más fuerte de las actividades de unión a FcyRIIaR y FcyRIIaH de una variante tienen una unión equivalente o reducida en comparación con la unión por la más fuerte de las actividades de unión a FcyRIIaR y FcyRIIaH del polipéptido original. Dado que este valor era de 0.7 a 5.0 para las variantes obtenidas esta vez, se puede decir que la unión por la más fuerte de las actividades de unión a FcyRIIaR y FcyRIIaH de las variantes obtenidas esta vez era casi la misma o disminuyó en comparación con el polipéptido original. Estos resultados mostraban que, en comparación con el polipéptido original, las variantes obtenidas esta vez han mantenido o disminuido las actividades de unión a FcyRIIa tipo R y tipo H y mejorado la actividad de unión a FcyRIIb, y por lo tanto han mejorado la selectividad para FcyRIIb. Además, en comparación con IL6R-F11, todas las variantes tenían menor afinidad por FcyRIa y FcyRIIIaV.

Tabla 14

ALTERACIÓN	KD [mol/L]				KD [IlaR]/ KD [Iib]	KD [IlaH]/ KD [Iib]	KD (Iib) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/ KD (Iib) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO	VALOR DE KD PARA LA MÁS FUERTE DE LAS ACTIVIDADES DE UNIÓN DE UNA VARIANTE A FcγRIIaR Y FcγRIIaH/VALOR DE KD PARA LA MÁS FUERTE DE LAS ACTIVIDADES DE UNIÓN DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL A FcγRIIaR Y FcγRIIaH
	FcγRIa	FcγRIIaR	FcγRIIaH	FcγRIIb				
*	3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	0.4	0.3	2.6	0.1
	9.0E-10	5.0E-06	5.0E-06	6.8E-06	0.7	0.7	1.0	1.0
I234W/P238D	6.3E-08	1.6E-05	1.9E-05	2.0E-06	8.1	9.5	3.4	3.2
I234Y/P238D	7.5E-08	2.6E-05	2.3E-05	1.6E-06	15.9	14.4	4.2	4.6
G237A/P238D	1.4E-07	3.2E-05	2.1E-05	3.0E-06	10.5	7.0	2.3	4.2
G237D/P238D	1.4E-07	2.1E-05	2.5E-05	2.0E-06	10.7	12.8	3.5	4.2
G237E/P238D	3.4E-07	3.8E-05	2.5E-05	3.6E-06	10.6	7.0	1.9	5.0
G237F/P238D	5.2E-08	1.4E-05	1.6E-05	3.4E-06	4.1	4.7	2.0	2.8
G237L/P238D	1.2E-07	1.8E-05	1.8E-05	2.6E-06	6.9	7.1	2.7	3.5
G237M/P238D	5.2E-08	2.2E-05	2.0E-05	2.9E-06	7.7	7.0	2.4	4.0
G237W/P238D	3.6E-08	7.2E-06	1.2E-05	2.3E-06	3.1	5.2	2.9	1.4
G237Y/P238D	9.3E-08	7.9E-06	1.5E-05	2.3E-06	3.4	6.4	2.9	1.6
P238D/S239D	4.9E-09	3.5E-06	1.9E-05	1.4E-06	2.6	14.0	5.0	0.7

Ejemplo 10. Análisis de la estructura cristalina de rayos X de un complejo formado entre un Fc que contiene P238D y una región extracelular de FcγRIIb

Como se indicó antes en el ejemplo 9, incluso aunque se introduce una alteración que se predice a partir del análisis de anticuerpos IgG1 naturales que mejora la actividad de unión a FcγRIIb o la selectividad para FcγRIIb en un Fc que contiene P238D, se encontró que la actividad de unión a FcγRIIb disminuía, y la razón de esto puede ser que la estructura en la interfase de interacción entre Fc y FcγRIIb cambia debido a la introducción de P238D. Por lo tanto, para buscar la razón de este fenómeno, se elucidó la estructura tridimensional del complejo formado entre un Fc de IgG1 que contiene la mutación P238D (en lo sucesivo, denominada Fc (P238D)) y la región extracelular de FcγRIIb por análisis de la estructura cristalina de rayos X, y esto se comparó con la estructura tridimensional del complejo formado entre el Fc de una IgG1 natural (en lo sucesivo, denominado Fc (WT)) y la región extracelular de FcγRIIb, y se compararon los modos de unión. Se han realizado múltiples informes sobre la estructura tridimensional de un complejo formado entre un Fc y una región extracelular de FcγR; y se han analizado las estructuras tridimensionales del complejo de Fc (WT)/región extracelular de FcγRIIb (*Nature* (2000) 400, 267-273; *J. Biol. Chem.* (2011) 276, 16469-16477), el complejo de Fc (WT)/región extracelular de FcγRIIIa (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2011) 108, 12669-126674), y el complejo de Fc (WT)/región extracelular de FcγRIIIa (*J. Immunol.* (2011) 187, 3208-3217). Aunque no se ha analizado la estructura tridimensional del complejo de Fc (WT)/región extracelular de FcγRIIb, FcγRIIIa, cuya estructura tridimensional en complejo con Fc (WT) ya se conoce, y FcγRIIb coinciden en el 93% en la secuencia de aminoácidos de su región extracelular y tienen una homología muy alta. Por lo tanto, la estructura tridimensional del complejo de Fc (WT)/región extracelular de FcγRIIb se predijo por modelización usando la estructura cristalina del complejo de Fc (WT)/región extracelular de FcγRIIIa.

La estructura tridimensional del complejo de Fc (P238D)/región extracelular de FcγRIIb se determinó por análisis de la estructura cristalina de rayos X a una resolución de 2.6 Å. La estructura obtenida como resultado de este análisis se muestra en la Fig. 21. La región extracelular de FcγRIIb está unida entre dos dominios de Fc CH2, y esto era similar a las estructuras tridimensionales de los complejos formados entre Fc (WT) y la región extracelular respectiva de FcγRIIIa, FcγRIIb o FcγRIIIa analizados hasta ahora. A continuación, para una comparación detallada, la estructura cristalina del complejo de Fc (P238D)/región extracelular de FcγRIIb y la estructura modelo del complejo de Fc (WT)/región extracelular de FcγRIIb se superpusieron por ajuste de mínimos cuadrados basado en las distancias de pares de átomos de Ca con respecto a la región extracelular de FcγRIIb y el dominio A de Fc CH2 (Fig. 22). En ese caso, el grado de superposición entre los dominios B de Fc CH2 no era satisfactorio, y se encontraron diferencias conformacionales en esta parte. Además, usando la estructura cristalina del complejo de Fc (P238D)/región extracelular de FcγRIIb y la estructura modelo del complejo de Fc (WT)/región extracelular de FcγRIIb, pares de átomos que tienen una distancia de 3.7 Å o menos entre la región de extracelular de FcγRIIb extraída y el dominio B de Fc CH2 se compararon para comparar la interacción interatómica entre FcγRIIb y dominio B de Fc (WT) CH2 con la interacción interatómica entre FcγRIIb y dominio B de Fc (P238D) CH2. Como se muestra en la Tabla 15, las interacciones interatómicas entre dominio B de Fc CH2 y FcγRIIb en Fc (P238D) y Fc (WT) no coincidían.

Tabla 15

FcγRIIb ÁTOMO	PAREJA DE INTERACCIÓN DE DOMINIO B CH2 (DE Fc (P238) DISTANCIA ENTRE ÁTOMOS, Å)				PAREJA DE INTERACCIÓN DE DOMINIO B CH2 DE Fc(WT) (DISTANCIA ENTRE ÁTOMOS, Å)			
Val 116 CG2					Asp 265 OD2 (3.47)			
Ser 126 OG	Ser 298 N (3.31)				Gly 237 O (3.65)			
	Ser 298 CB (3.32)							
	Tyr 296 O (3.05)							
Lys 128 CA	Ser 298 OG (3.50)							
Phe 129 CB	Ser 298 O (3.36)							
Phe 129 CD2					Asn 297 CB (3.50)			
					Asn 297 CG (3.43)			
Lys 128 C	Ser 298 OG (3.47)							
Phe 129 N	Ser 298 OG (3.30)							
Phe 129 O	Ser 267 OG (3.54)							
Arg 131 CB					Val 266 O (3.02)			
Arg 131 CG					Val 266 O (3.22)			

FcγRIIb ÁTOMO	PAREJA DE INTERACCIÓN DE DOMINIO B CH2 (DE Fc (P238) DISTANCIA ENTRE ÁTOMOS, Å)				PAREJA DE INTERACCIÓN DE DOMINIO B CH2 DE Fc(WT) (DISTANCIA ENTRE ÁTOMOS, Å)			
Arg 131 CD					Val 266	CG1	(3.45)	
					Val 266	C	(3.55)	
					Val 266	O	(3.10)	
Arg 131 NE	Ala 327	O	(3.60)		Val 266	C	(3.66)	
					Val 266	O	(3.01)	
					Val 266	N	(3.49)	
Arg 131 CZ	Asp 270	CG	(3.64)		Val 266	N	(3.13)	
	Asp 270	OD2	(3.22)					
	Asp 327	OD1	(3.27)					
	Ala 327	CB	(3.63)					
Arg 131 NH1	Asp 270	CG	(3.19)		Val 266	CG1	(3.47)	
	Asp 270	OD2	(2.83)		Val 266	N	(3.43)	
	Asp 270	OD1	(2.99)		Thr 299	OG1	(3.66)	
	Ser 267	CB	(3.56)		Ser 298	O	(3.11)	
Arg 131 NH2	Asp 270	CG	(3.20)		Asp 265	CA	(3.16)	
	Asp 270	OD2	(2.80)		Val 266	N	(3.37)	
	Asp 270	OD1	(2.87)					
	Ala 327	CB	(3.66)					
Tyr 157 CE1					Leu 234	CG	(3.64)	
					Leu 234	CD1	(3.61)	
Tyr 157 OH					Gly 236	O	(3.62)	
					Leu 234	CA	(3.48)	
					Leu 234	CG	(3.45)	

Además, las estructuras detalladas alrededor de P238D se compararon superponiendo la estructura cristalina de rayos X del complejo de Fc (P238D)/región extracelular de FcγRIIb en la estructura modelo del complejo de Fc (WT)/región extracelular de FcγRIIb usando el método de mínimos cuadrados basado la distancia atómica de Cα entre los dominios A y B de Fc CH2 solos. Como la posición del resto de aminoácido en la posición 238 (numeración EU), es decir, una posición de mutagénesis de Fc (P238D), se altera de Fc (WT), la estructura de bucle alrededor del resto de aminoácido en la posición 238 después de la región bisagra se encuentra que es diferente entre Fc (P238D) y Fc (WT) (Fig. 23). La Pro en la posición 238 (numeración EU) se encuentra originalmente dentro de Fc (WT), formando un núcleo hidrofóbico con restos alrededor de la posición 238. Sin embargo, si la Pro en la posición 238 (numeración EU) se altera a Asp altamente hidrófila y cargada, la presencia del resto de Asp alterado en un núcleo hidrofóbico es energéticamente desventajosa en términos de desolvatación. Por lo tanto, en Fc (P238D), para cancelar esta situación energéticamente desventajosa, el resto de aminoácido en la posición 238 (numeración EU) cambia su orientación para enfrentar la región del disolvente, y esto puede haber causado este cambio en la estructura del bucle cerca del resto de aminoácido en la posición 238. Además, dado que este bucle no está lejos de la región bisagra entrecruzada por enlaces S-S, su cambio estructural no se limitará a un cambio local y afectará el posicionamiento relativo entre el dominio A y el dominio B de FcCH2. Como resultado, se asumió que las interacciones interatómicas entre FcγRIIb y el dominio B de Fc CH2 habían cambiado. Por lo tanto, no se pudieron observar los efectos previstos cuando las alteraciones que mejoran la selectividad y la actividad de unión hacia FcγRIIb en una IgG natural se combinaron con un Fc que contenía la alteración P238D.

Además, como resultado de cambios estructurales debido a la introducción de P238D en el dominio A CH2 de Fc, se ha encontrado un enlace de hidrógeno entre la cadena principal de Gly en la posición 237 (numeración EU), que está adyacente a P238D que está mutado, y la Tyr en la posición 160 en FcγRIIb (Fig. 24). El resto en FcγRIIa que corresponde a esta Tyr 160 es Phe; y cuando la unión es a FcγRIIa, este enlace de hidrógeno no se forma. Teniendo en cuenta que el aminoácido en la posición 160 es una de las pocas diferencias entre FcγRIIa y FcγRIIb en la interfase de interacción con Fc, se asume que la presencia de este enlace de hidrógeno que es específico de FcγRIIb ha conducido a la mejora de la actividad de unión a FcγRIIb y la disminución de la actividad de unión a FcγRIIa en Fc

(P238D) y la mejora de su selectividad. Además, en el dominio B de Fc CH2, se observa una interacción electrostática entre el Asp en la posición 270 (numeración EU) y la Arg en la posición 131 en FcγRIIb (Fig. 25). En FcγRIIa tipo H, que es uno de los alotipos de FcγRIIa, el resto que corresponde a la Arg en la posición 131 de FcγRIIb es His y, por lo tanto, no puede formar esta interacción electrostática. Esto puede explicar por qué la actividad de unión a Fc (P238D) se reduce en FcγRIIa tipo H en comparación con FcγRIIa tipo R. Las observaciones basadas en dichos resultados del análisis de la estructura cristalina de rayos X mostraron que el cambio de la estructura de bucle cerca de P238D debido a la introducción de P238D y el cambio que acompaña al posicionamiento relativo del dominio produce la formación de nuevas interacciones que no se encuentran en la unión de la IgG natural y FcγR, y esto podría conducir a un perfil de unión selectiva de variantes P238D para FcγRIIb.

Expresión y purificación de Fc (P238D)

Se preparó un Fc que contenía la alteración P238D como sigue. Primero, la Cys en la posición 220 (numeración EU) de hIL6R-IgG1-v1 (SEQ ID NO: 62) se sustituyó por Ser. Después, la secuencia genética de Fc (P238D) desde Glu en la posición 236 (numeración EU) a su C terminal se clonó por PCR. Usando esta secuencia genética clonada, la producción de vectores de expresión y la expresión y purificación de Fc (P238D) se llevaron a cabo de acuerdo con el método del ejemplo de referencia 1. La Cys en la posición 220 (numeración EU) forma un enlace disulfuro con la Cys de la cadena L en la IgG1 general. La cadena L no se coexpresa cuando se prepara Fc solo, y por lo tanto, el resto de Cys se sustituyó por Ser para evitar la formación de enlaces disulfuro innecesarios.

Expresión y purificación de la región extracelular de FcγRIIb.

La región extracelular de FcγRIIb se preparó de acuerdo con el método del ejemplo de referencia 2.

Purificación del complejo de Fc (P238D)/región extracelular de FcγRIIb

A 2 mg de la muestra de región extracelular de FcγRIIb obtenida para usar en cristalización, se añadieron 0.29 mg de Endo F1 (*Protein Science* (1996) 5: 2617-2622) expresado y purificado de *Escherichia coli* como una proteína de fusión glutatión S-transferasa. Esto se dejó permanecer a temperatura ambiente durante tres días en tampón Bis-Tris 0.1 M a pH 6.5, y las cadenas de azúcar unidas a N se escindieron, excepto la N-acetilglucosamina directamente unida a la Asn de la región extracelular de FcγRIIb. A continuación, la muestra de la región extracelular de FcγRIIb sometida a tratamiento de escisión de la cadena de azúcar, que se concentró por ultrafiltración con MWCO de 5000, se purificó por cromatografía de filtración en gel (Superdex200 10/300) usando una columna equilibrada en HEPS 20 mM a pH 7.5 que contenía NaCl 0.05 M. Además, a la fracción de región extracelular de FcγRIIb escindida del carbohidrato obtenida, se añadió Fc (P238D) de modo que la relación molar de la región extracelular de FcγRIIb estaría presente en un ligero exceso. La mezcla concentrada por ultrafiltración con MWCO de 10 000 se purificó por cromatografía de filtración en gel (Superdex200 10/300) usando una columna equilibrada en HEPS 20 mM a pH 7.5 que contenía NaCl 0.05 M. Por lo tanto, se obtuvo una muestra del complejo de Fc (P238D)/región extracelular de FcγRIIb.

Cristalización del complejo de Fc (P238D)/región extracelular de FcγRIIb

Usando la muestra del complejo de Fc (P238D)/región extracelular de FcγRIIb que se concentró a aproximadamente 10 mg/ml por ultrafiltración con MWCO de 10 000, la cristalización del complejo se llevó a cabo por el método de difusión de vapor en gota sedente. Se usó Hydra II Plus One (MATRIX) para la cristalización; y para una solución de depósito que contenía Bis-Tris 100 mM a pH 6.5, PEG3350 al 17%, acetato de amonio 0.2 M y D-galactosa al 2.7% (p/v), se produjo una gota de cristalización mezclando una relación de solución de depósito:muestra de cristalización = 0.2 µl:0.2 µl. Se dejó que la gota de cristalización después del sellado permaneciera a 20°C, y de este modo se obtuvieron cristales delgados en forma de placas.

Medición de datos de difracción de rayos X de un cristal de complejo de Fc (P238D)/región extracelular de FcγRIIb

Uno de los monocristales obtenidos del complejo de Fc (P238D)/región extracelular de FcγRIIb se sumergió en una solución de Bis-Tris 100 mM a pH 6.5, PEG3350 al 20%, acetato de amonio, D-galactosa al 2.7% (p/v), etilenglicol al 22.5% (v/v). El monocristal se sacó de la solución usando un alfiler con un diminuto lazo de nylon y se congeló en nitrógeno líquido. Después, se midieron los datos de difracción de rayos X del cristal en la instalación de radiación de sincrotrón Photon Factory BL-1A en la Organización para la Investigación de Altas Energías con Aceleradores. Durante la medición, el cristal se colocó constantemente en una corriente de nitrógeno a -178°C para mantenerlo en estado congelado, y se recogieron un total de 225 imágenes de difracción de rayos X usando el detector CCD Quantum 270 (ADSC) conectado a una línea de haz con rotación del cristal de 0.8° cada vez. La determinación de los parámetros celulares, indexación de las manchas de difracción y el procesamiento de datos de difracción de las imágenes de difracción obtenidas se llevaron a cabo usando el programa Xia2 (CCP4 Software Suite), el paquete XDS (Walfgang Kabsch) y Scala (CCP4 Software Suite); y finalmente, se obtuvieron datos de intensidad de difracción del cristal hasta una resolución de 2.46 Å. El cristal pertenece al grupo espacial P21 y tiene los siguientes parámetros de celda; a = 48.85 Å, b = 76.01 Å, c = 115.09 Å, α = 90°, β = 100.70°, γ = 90°.

Análisis de la estructura cristalina de rayos X del complejo de Fc (P238D)/región extracelular de FcγRIIb

La estructura cristalina del complejo de Fc (P238D)/región extracelular de FcγRIIb se determinó mediante el método

de reemplazo molecular usando el programa Phaser (CCP4 Software Suite). A partir del tamaño de la red cristalina obtenida y el peso molecular del complejo de Fc (P238D)/región extracelular de FcγRIIb, se predijo que el número de complejos en la unidad asimétrica era uno. A partir de las coordenadas estructurales del código PDB: 3SGJ, que es la estructura cristalina del complejo de Fc (WT)/región extracelular de FcγRIIIa, se tomaron las porciones de restos de aminoácidos de las posiciones 239-340 de la cadena A y las posiciones 239-340 de la cadena B como coordenadas separadas, y se establecieron respectivamente como modelos para buscar los dominios CH2 de Fc. Las porciones de restos de aminoácidos de las posiciones 341-444 de la cadena A y las posiciones 341-444 de la cadena B se tomaron como un solo conjunto de coordenadas de las mismas coordenadas estructurales del código PDB: 3SGJ; y esto se estableció como un modelo para buscar los dominios CH3 de Fc. Finalmente, a partir de las coordenadas estructurales del código PDB: 2FCB, que es una estructura cristalina de la región extracelular de FcγRIIb, se tomaron las porciones de restos de aminoácidos de las posiciones 6-178 de la cadena A y establecieron como modelo para buscar la región extracelular de FcγRIIb. La orientación y posición de cada modelo de búsqueda en la red cristalina se determinó en el orden del dominio Fc CH3, región extracelular de FcγRIIb y dominio CH2 de Fc, basándose en la función de rotación y la función de traducción para obtener el modelo inicial para la estructura cristalina del complejo de Fc (P238D)/región extracelular de FcγRIIb. Cuando el refinamiento del cuerpo rígido que mueve los dos dominios CH2 de Fc, los dos dominios CH3 de Fc y la región extracelular de FcγRIIb se realizó en el modelo inicial obtenido, el factor de fiabilidad cristalográfica, el valor R se convirtió en 40.4% y el valor R libre se convirtió en 41.9% para datos de intensidad de difracción de 25 Å a 3.0 Å en este punto. Además, el refinamiento estructural usando el programa Refmac5 (CCP4 Software Suite), y la revisión del modelo para observar los mapas de densidad electrónica cuyo coeficiente tiene 2Fo-Fc o Fo-Fc, que se calculan basándose en el factor estructural Fo determinado experimentalmente, el factor estructural Fc calculado y la fase calculada usando el modelo, se llevaron a cabo mediante el programa Coot (Paul Emsley). El refinamiento del modelo se llevó a cabo repitiendo estas etapas. Finalmente, como resultado de la incorporación de moléculas de agua en el modelo basado en los mapas de densidad electrónica que usan 2Fo-Fc o Fo-Fc como coeficiente, y el siguiente refinamiento, el factor de fiabilidad cristalográfica, los valores R y el valor R libre del modelo que contenía 4846 átomos que no eran de hidrógeno se convirtió en 23.7% y 27.6% para 24291 datos de intensidad de difracción de resolución de 25 Å a 2.6 Å, respectivamente.

Producción de una estructura modelo del complejo de Fc (WT)/región extracelular de FcγRIIb

Basándose en las coordenadas estructurales del código PDB: 3RY6, que es una estructura cristalina del complejo de Fc (WT)/región extracelular de FcγRIIa, se usó la función Build Mutants del programa Discovery Studio 3.1 (Accelrys) para introducir mutaciones para coincidir con la secuencia de aminoácidos de FcγRIIb en FcγRIIa en estas coordenadas estructurales. En ese caso, el nivel de optimización se estableció en Alto, el Radio de corte se configuró en 4.5, se generaron cinco modelos, y el que tenía la mejor puntuación de energía entre ellos se estableció como la estructura modelo para el complejo de Fc (WT)/región extracelular de FcγRIIb.

Ejemplo 11. Análisis de la unión a FcγR de variantes de Fc cuyos sitios de alteración se determinaron basándose en estructuras cristalinas

Basándose en los resultados del análisis de la estructura cristalina de rayos X del complejo formado entre Fc (P238D) y la región extracelular de FcγRIIb obtenida en el Ejemplo 10, se construyeron variantes introduciendo de manera extensa alteraciones en los sitios en el Fc alterado que tenían sustitución de Pro en la posición 238 (Numeración de la UE) por Asp que se predijo que afectaba a la interacción con FcγRIIb (restos de las posiciones 233, 240, 241, 263, 265, 266, 267, 268, 271, 273, 295, 296, 298, 300, 323, 325, 326, 327, 328, 330, 332 y 334 (numeración EU)), y se examinó si se pueden obtener combinaciones de alteraciones que mejoren más la unión a FcγRIIb además de la alteración P238D.

IL6R-B3 (SEQ ID NO: 63) se produjo introduciendo en IL6R-G1d (SEQ ID NO: 54), la alteración producida por sustitución de la Lys en la posición 439 (numeración EU) por Glu. A continuación, se produjo IL6R-BF648 introduciendo en IL6R-B3, la alteración producida por sustitución de la Pro en la posición 238 (numeración EU) por Asp. Se usó IL6R-L (SEQ ID NO: 56) como la cadena L de anticuerpo común. Estas variantes de anticuerpos expresadas se purificaron según el método del ejemplo de referencia 1. La unión de estas variantes de anticuerpo para cada uno de los FcγR (FcγRIa, FcγRIIa tipo H, FcγRIIa tipo R, FcγRIIb y FcγRIIIa tipo V) se evaluó exhaustivamente por el método del ejemplo de referencia 2.

Se produjo una figura de acuerdo con el siguiente método para mostrar los resultados del análisis de las interacciones con los respectivos FcγR. El valor para la cantidad de unión de cada variante a cada FcγR se dividió entre el valor para la cantidad de unión del anticuerpo de control previamente alterado (IL6R-BF648/IL6R-L, alteración por sustitución de Pro en la posición 238 (numeración EU) por Asp) a cada FcγR, y lo obtenido se multiplicó después por 100 y se mostró como el valor de la actividad de unión relativa de cada variante a cada FcγR. El eje horizontal muestra el valor de la actividad de unión relativa de cada variante a FcγRIIb, y el eje vertical muestra el valor de la actividad de unión relativa de cada variante a FcγRIIa tipo R (Fig. 26).

Como se muestra en la Fig. 26, los resultados muestran que de todas las alteraciones, se encontró que 24 tipos de alteraciones mantienen o mejoran la unión a FcγRIIb en comparación con el anticuerpo previamente alterado. La unión de estas variantes a cada uno de los FcγR se muestra en la Tabla 16. En la tabla, la alteración se refiere a la alteración introducida en IL6R-B3 (SEQ ID NO: 63). El molde usado para producir IL6R-B3, IL6R-G1d/IL6R-L, se indica con un asterisco (*).

Tabla 16

Nombre de variante	Alteración	Unión relativa				
		FcyRIa	FcyRIIaR	FcyRIIaH	FcyRIIb	FcyRIIIa
IL6R-G1d/IL6R-L	*	140	650	1670	62	3348
IL6R-B3/IL6R-L		145	625	1601	58	3264
IL6R-BF648/IL6R-L	P238D	100	100	100	100	100
IL6R-2B002/IL6R-L	P238D/E233D	118	103	147	116	147
IL6R-BP100/IL6R-L	P238D/S267A	121	197	128	110	138
IL6R-BP102/IL6R-L	P238D/S267Q	104	165	66	106	86
IL6R-BP103/IL6R-L	P238D/S267V	56	163	69	107	77
IL6R-BP106/IL6R-L	P238D/H268D	127	150	110	116	127
IL6R-BP107/IL6R-L	P238D/H268E	123	147	114	118	129
IL6R-BP110/IL6R-L	P238D/H268N	105	128	127	101	127
IL6R-BP112/IL6R-L	P238D/P271G	119	340	113	157	102
IL6R-2B128/IL6R-L	P238D/Y296D	95	87	37	103	96
IL6R-2B169/IL6R-L	P238D/V3231	73	92	83	104	94
IL6R-2B171/IL6R-L	P238D/V323L	116	117	115	113	122
IL6R-2B172/IL6R-L	P238D/V323M	140	244	179	132	144
IL6R-BP136/IL6R-L	P238D/K326A	117	159	103	119	102
IL6R-BP117/IL6R-L	P238D/K326D	124	166	96	118	105
IL6R-BP120/IL6R-L	P238D/K326E	125	175	92	114	103
IL6R-BP126/IL6R-L	P238D/K326L	113	167	132	103	146
IL6R-BP119/IL6R-L	P238D/K326M	117	181	133	110	145
IL6R-BP142/IL6R-L	P238D/K326N	98	103	97	106	102
IL6R-BP121/IL6R-L	P238D/K326Q	118	155	135	113	157
IL6R-BP118/IL6R-L	P238D/K326S	101	132	128	104	144
IL6R-BP116/IL6R-L	P238D/K326T	110	126	110	108	114
IL6R-BP911/IL6R-L	P238D/A330K	52	101	108	119	120
IL6R-BP078/IL6R-L	P238D/A330M	106	101	89	105	91
IL6R-BP912/IL6R-L	P238D/A330R	60	81	93	103	97

Los resultados de la medición de los valores de KD de las variantes mostradas en la Tabla 16 para los tipos V FcyRIa, FcyRIIaR, FcyRIIaH, FcyRIIb y FcyRIIIa por el método del ejemplo de referencia 2 se resumen en la Tabla 13. En la tabla, la alteración se refiere a la alteración introducida en IL6R-B3 (SEQ ID NO: 63). El molde usado para producir IL6R-B3, IL6R-G1d/IL6R-L, se indica con un asterisco (*). Además, KD (IIaR)/KD (IIb) y KD (IIaH)/KD (IIb) en la tabla representan respectivamente el valor obtenido dividiendo el valor de KD de cada variante para FcyRIIaR entre el valor de KD de cada variante para FcyRIIb, y el valor obtenido dividiendo el valor de KD de cada variante para FcyRIIaH entre el valor de KD de cada variante para FcyRIIb. KD (IIb) del polipéptido original/KD (IIb) del polipéptido alterado se refiere al valor obtenido dividiendo el valor KD del polipéptido original para FcyRIIb entre el valor de KD de cada variante para FcyRIIb. Además, el valor de KD para la más fuerte de las actividades de unión a FcyRIIaR y FcyRIIaH de cada variante/valor de KD para la más fuerte de las actividades de unión a FcyRIIaR y FcyRIIaH del polipéptido original se muestra en la Tabla 17. Aquí, el polipéptido original se refiere a la variante que tiene IL6R-B3 (SEQ ID NO: 63) como la cadena H. Se determinó que debido a la débil unión de FcyR a IgG, era imposible analizar con precisión por análisis cinético y, por lo tanto, las celdas sombreadas en gris en la Tabla 17 muestran valores calculados usando la ecuación 2 del ejemplo de referencia 2.

Ecuación 2

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

Tabla 17

NOMBRE DE VARIANTE	ALTERACIÓN	KD[μmol/L]					F _{cyRIIa}	F _{cyRIIaR}	F _{cyRIIaH}	F _{cyRIIb}	F _{cyRIIaV}	KD[μaR]/ KD[μb]	KD[μaH]/ KD[μb]	KD[μb] DEL POLIPEPTIDO ORIGINAL / KD[μb] DEL POLIPEPTIDO ALTERADO	VALOR DE KD PARA LA MÁS FUERTE DE LAS ACTIVIDADES DE UNIÓN A F _{cyRIIaR} Y F _{cyRIIaH} DE LA VARIANTE / VALOR DE KD PARA LA MÁS FUERTE DE LAS ACTIVIDADES DE UNIÓN A F _{cyRIIaR} Y F _{cyRIIaH} DEL POLIPEPTIDO ORIGINAL
		F _{cyRIa}	F _{cyRIIaR}	F _{cyRIIaH}	F _{cyRIIb}	F _{cyRIIaV}									
IL6R-G1a/IL6R-L		3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07						0.4	0.3	1.2	0.9
IL6R-B3/IL6R-L		4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07						0.3	0.2	1.0	1.0
IL6R-BP648/IL6R-L		1.1E-08	1.5E-05	4.0E-05	1.2E-06	7.1E-05						13.0	33.9	2.6	19.9
IL6R-2B002/IL6R-L	P238D	6.4E-09	1.9E-05	8.6E-05	9.3E-07	5.3E-05						20.4	92.3	3.3	24.7
IL6R-BP100/IL6R-L	P238D/S267A	1.1E-09	7.3E-06	4.6E-05	1.1E-06	5.9E-05						7.3	42.6	2.9	10.2
IL6R-BP102/IL6R-L	P238D/S267Q	8.2E-09	8.4E-06	6.1E-05	9.0E-07	8.2E-05						9.4	67.6	3.4	11.0
IL6R-BP103/IL6R-L	P238D/S267W	3.5E-08	1.1E-05	8.8E-05	1.2E-06	1.1E-04						9.0	71.5	2.5	14.4
IL6R-BP106/IL6R-L	P238D/H268D	4.0E-09	1.1E-05	3.6E-05	9.3E-07	5.5E-05						11.6	38.7	3.3	14.0
IL6R-BP107/IL6R-L	P238D/H268E	1.5E-09	1.2E-05	5.2E-05	9.3E-07	6.3E-05						12.7	56.1	3.3	15.3
IL6R-BP110/IL6R-L	P238D/H268N	7.3E-09	1.7E-05	4.7E-05	1.5E-06	6.4E-05						11.7	31.5	2.1	22.6
IL6R-BP112/IL6R-L	P238D/P271G	6.5E-09	3.5E-06	3.5E-05	3.2E-07	6.9E-05						11.0	109.4	9.7	4.6
IL6R-2B128/IL6R-L	P238D/V294D	1.3E-08	2.6E-05	3.4E-05	1.4E-06	7.2E-05						17.7	23.6	2.1	33.1
IL6R-2B169/IL6R-L	P238D/V323I	2.5E-08	1.9E-05	4.8E-05	1.2E-06	7.5E-05						15.8	40.7	2.6	24.3
IL6R-2B171/IL6R-L	P238D/V323L	9.1E-09	1.6E-05	3.4E-05	1.1E-06	5.7E-05						15.0	31.8	2.9	20.8
IL6R-2B172/IL6R-L	P238D/V323M	3.0E-09	6.1E-06	2.1E-05	7.7E-07	4.8E-05						8.0	27.3	4.0	8.0
IL6R-BP136/IL6R-L	P238D/K326A	6.5E-09	9.1E-06	3.8E-05	8.0E-07	6.9E-05						11.4	47.6	3.9	11.8
IL6R-BP117/IL6R-L	P238D/K326D	4.1E-09	9.2E-06	4.1E-05	8.0E-07	6.7E-05						11.6	51.4	3.9	12.0
IL6R-BP120/IL6R-L	P238D/K326E	6.6E-09	9.6E-06	6.5E-05	1.0E-06	7.9E-05						9.3	63.1	3.0	12.5
IL6R-BP126/IL6R-L	P238D/K326L	7.4E-09	1.1E-05	4.5E-05	1.4E-06	5.6E-05						7.8	31.7	2.2	14.4
IL6R-BP119/IL6R-L	P238D/K326M	7.0E-09	9.9E-06	4.5E-05	1.1E-06	5.6E-05						8.7	39.5	2.7	12.8
IL6R-BP142/IL6R-L	P238D/K326N	5.3E-09	1.8E-05	9.3E-05	1.2E-06	1.1E-04						15.5	79.5	2.6	23.5
IL6R-BP121/IL6R-L	P238D/K326Q	1.1E-08	1.3E-05	4.4E-05	1.1E-06	5.2E-05						11.7	40.4	2.8	16.6
IL6R-BP118/IL6R-L	P238D/K326S	1.2E-08	1.5E-05	4.6E-05	1.2E-06	5.6E-05						13.2	40.0	2.7	19.7
IL6R-BP116/IL6R-L	P238D/K326T	2.6E-09	1.5E-05	5.4E-05	1.1E-06	7.2E-05						13.3	48.2	2.8	19.4
IL6R-BP911/IL6R-L	P238D/A330K	4.9E-08	1.6E-05	3.7E-05	8.9E-07	5.8E-05						18.5	41.7	3.5	21.3
IL6R-BP078/IL6R-L	P238D/A330M	8.2E-09	1.5E-05	4.5E-05	1.1E-06	7.8E-05						13.4	41.3	2.8	19.0
IL6R-BP912/IL6R-L	P238D/A330R	3.8E-08	2.6E-05	3.8E-05	1.5E-06	7.8E-05						17.8	25.9	2.1	34.0

La Tabla 17 muestra que, en comparación con IL6R-B3, todas las variantes mostraban mejora de la afinidad por FcγRIIb, y el intervalo de mejora era de 2.1 veces a 9.7 veces. La relación del valor de KD de cada variante para FcγRIIaR/valor de KD de cada variante para FcγRIIb, y la relación del valor de KD de cada variante para FcγRIIaH/valor de KD de cada variante para FcγRIIb, representan una actividad de unión a FcγRIIb en relación con la unión a FcγRIIaR actividad y actividad de unión a FcγRIIaH, respectivamente. Es decir, estos valores muestran el grado de selectividad de unión de cada variante para FcγRIIb, y un valor mayor indica una mayor selectividad de unión para FcγRIIb. Puesto que la relación del valor de KD para FcγRIIaR/valor de KD para FcγRIIb, y la relación del valor de KD para FcγRIIaH/valor de KD para FcγRIIb en el polipéptido original IL6R-B3/IL6R-L era 0.3 y 0.2, respectivamente, todas las variantes en la Tabla 17 mostraban mejora de la selectividad de unión para FcγRIIb en comparación con el polipéptido original. Cuando el valor de KD para la más fuerte de las actividades de unión a FcγRIIaR y FcγRIIaH de una variante/valor de KD para la más fuerte de las actividades de unión a FcγRIIaR y FcγRIIaH del polipéptido original es 1 o más, esto significa que la más fuerte de las actividades de unión a FcγRIIaR y FcγRIIaH de una variante tienen una unión equivalente o menor en comparación con la unión para la más fuerte de las actividades de unión a FcγRIIaR y FcγRIIaH del polipéptido original. Puesto que este valor era de 4.6 a 34.0 para las variantes obtenidas esta vez, se puede decir que en comparación con el polipéptido original, las variantes obtenidas esta vez tenían menor unión para la más fuerte de las actividades de unión a FcγRIIaR y FcγRIIaH. Estos resultados mostraban que, en comparación con el polipéptido original, las variantes obtenidas esta vez han mantenido o disminuido las actividades de unión a FcγRIIa tipo R y tipo H, mejorado la actividad de unión a FcγRIIb y mejorado la selectividad para FcγRIIb. Además, en comparación con IL6R-B3, todas las variantes tenían menor afinidad por FcγRIa y FcγRIIaV.

Con respecto a las variantes promotoras entre las variantes de combinación obtenidas, se investigaron los factores que conducen a sus efectos usando la estructura cristalina. La figura 27 muestra la estructura cristalina del complejo de Fc (P238D)/región extracelular de FcγRIIb. En esta figura, la cadena H situada en el lado izquierdo es la cadena A de Fc, y la cadena H situada en el lado derecho es la cadena B de Fc. Aquí se puede ver que el sitio en la posición 233 (numeración EU) en la cadena A de Fc está situado cerca de la Lys en la posición 113 de FcγRIIb. Sin embargo, en esta estructura cristalina, la cadena lateral E233 está en unas condiciones de movilidad considerablemente alta, y su densidad electrónica no se observa bien. Por lo tanto, la alteración producida por sustitución del Glu en la posición 233 (numeración EU) por Asp conduce a una disminución en el grado de libertad de la cadena lateral, ya que la cadena lateral se hace un carbono más corta. Como resultado, la pérdida de entropía cuando se forma una interacción con Lys en la posición 113 de FcγRIIb puede disminuir, y en consecuencia se especula que esto contribuye a mejorar la energía libre de la unión.

De manera similar, la Fig. 28 muestra el entorno cercano al sitio en la posición 330 (numeración EU) en la estructura del complejo de Fc (P238D)/región extracelular de FcγRIIb. Esta figura muestra que el entorno del sitio en la posición 330 (numeración EU) de la cadena A de Fc de Fc (P238D) es un entorno hidrofílico compuesto por Ser en la posición 85, Glu en la posición 86, Lys en la posición 163 y similar de FcγRIIb. Por lo tanto, se especula que la alteración producida por sustitución de la Ala en la posición 330 (numeración EU) por Lys o Arg contribuye a fortalecer la interacción con Ser en la posición 85 o Glu en la posición 86 en FcγRIIb.

La figura 29 representa las estructuras de la Pro en la posición 271 (numeración EU) de la cadena B de Fc después de superposición de las estructuras cristalinas del complejo de Fc (P238D)/región extracelular de FcγRIIb y el complejo de Fc (WT)/región extracelular de FcγRIIa por el ajuste por mínimos cuadrados basado en las distancias de pares de átomos Ca con respecto a la cadena B de Fc. Estas dos estructuras coinciden bien, pero tienen diferentes estructuras tridimensionales de la Pro en la posición 271 (numeración EU). Cuando también se tiene en cuenta la débil densidad electrónica alrededor de esta área en la estructura cristalina del complejo de Fc (P238D)/región extracelular de FcγRIIb, se sugiere que existe la posibilidad de que la Pro en la posición 271 (numeración EU) en Fc (P238D)/FcγRIIb produzca una gran tensión en la estructura, alterando así la estructura del bucle para lograr una estructura óptima. Por lo tanto, la alteración producida por sustitución de la Pro en la posición 271 (numeración EU) por Gly da flexibilidad a esta estructura de bucle, y se especula que contribuye a mejorar la unión al reducir la barrera energética cuando se permite que se forme una estructura óptima durante la interacción con FcγRIIb.

Ejemplo 12. Examen del efecto combinatorio de alteraciones que mejoran la unión a FcγRIIb cuando se combinan con P238D

De las alteraciones obtenidas en los ejemplos 9 y 11, las que aumentaban la unión a FcγRIIb o mantenían la unión a FcγRIIb y mostraban efectos de supresión de la unión a otros FcγR se combinaron entre sí, y se examinó su efecto.

Se introdujeron alteraciones particularmente buenas seleccionadas de las Tablas 13 y 17 en la cadena H del anticuerpo IL6R-BF648 de manera similar al método del ejemplo 11. Se usó IL6R-L como la cadena L del anticuerpo, los anticuerpos expresados se purificaron según el método del ejemplo de referencia 1. La unión a cada uno de los FcγR (FcγRIa, FcγRIIa tipo H, FcγRIIa tipo R, FcγRIIb y FcγRIIa tipo V) se evaluó exhaustivamente por el método del ejemplo de referencia 2.

De acuerdo con el siguiente método, se calcularon las actividades de unión relativas para los resultados del análisis de las interacciones con los respectivos FcγR. El valor para la cantidad de unión de cada variante a cada FcγR se dividió entre el valor para la cantidad de unión del anticuerpo de control previamente alterado (IL6R-BF648/IL6R-L con sustitución de Pro en la posición 238 (numeración EU) por Asp a cada FcγR, y multiplicado por 100; y después el valor

se mostró como el valor de la actividad de unión relativa de cada variante a cada FcγR (Tabla 18). En la tabla, la alteración se refiere a la alteración introducida en IL6R-B3 (SEQ ID NO: 63). El molde usado para producir IL6R-B3, IL6R-G1d/IL6R-L, se indica con un asterisco (*).

Tabla 18-1

5

Nombre de variante	Alteración	Actividad de unión relativa				
		FcgRIIa	FcgRIIaR	FcgRIIaH	FcgRIIb	FcgRIIaV
IL6R-G1a/IL6R-L		140	650	1670	62	3348
IL6R-B3/IL6R-L		145	625	1601	58	3264
IL6R-BF648/IL6R-L	P238D	100	100	100	100	100
IL6R-2B253/IL6R-L	B233D/P238D/V323M	155	288	207	156	126
IL6R-2B261/IL6R-L	B233D/P238D/Y296D	100	94	91	115	87
IL6R-BP082/IL6R-L	B233D/P238D/A330K	74	126	106	136	87
IL6R-BP083/IL6R-L	P238D/Y296D/A330K	50	87	91	122	107
IL6R-BP084/IL6R-L	P238D/V323M/A330K	109	203	162	141	106
IL6R-BP085/IL6R-L	G237D/P238D/A330K	19	279	158	152	104
IL6R-BP086/IL6R-L	P238D/K326A/A330K	72	155	116	137	123
IL6R-BP087/IL6R-L	L234Y/P238D/A330K	33	163	179	137	158
IL6R-BP088/IL6R-L	G237D/P238D/K326A/A330K	25	377	166	161	122
IL6R-BP089/IL6R-L	L234Y/F238D/K326A/A330K	43	222	186	147	136
IL6R-BP129/IL6R-L	B233D/P238D/Y296D/A330K	68	111	98	138	95
IL6R-BP130/IL6R-L	B233D/P238D/V323M/A330K	104	272	224	160	115
IL6R-BP131/IL6R-L	B233D/G237D/P238D/A330K	33	364	253	160	118
IL6R-BP132/IL6R-L	B233D/P238D/K326A/A330K	91	191	130	150	120
IL6R-BP133/IL6R-L	B233D/L334Y/P238D/A330K	41	174	151	137	114
IL6R-BP143/IL6R-L	L234Y/P238D/K326A	86	238	143	133	114
IL6R-BP144/IL6R-L	G237D/P238D/K326A	64	204	108	121	128
IL6R-BP145/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D	41	350	224	153	153
IL6R-BP146/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A	50	445	203	156	180
IL6R-BP147/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	24	650	582	177	209
IL6R-BP148/IL6R-L	B233D/L234Y/G237D/P238D/K326A/A330K	33	603	462	176	227
IL6R-BP149/IL6R-L	B233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330K	29	539	401	173	186
IL6R-BP150/IL6R-L	L234Y/G237D/P238D/K326A/A330R	30	757	770	183	204
IL6R-BP151/IL6R-L	B233D/L334Y/G237D/P238D/K326A/A330R	39	705	621	180	221
IL6R-BP152/IL6R-L	B233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326A/A330R	34	638	548	178	146
IL6R-BP176/IL6R-L	B233D/P238D/E326D/A330K	102	201	128	147	131
IL6R-BP177/IL6R-L	B233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330K	57	691	409	177	186
IL6R-BP176/IL6R-L	B233D/G237D/P238D/P271G/A330K	51	653	259	179	110
IL6R-BP179/ IL6R-L	G237D/P23D/P27 1G/ K326A/A330K	39	570	226	177	125
IL6R-BP180/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/A330K	29	602	203	179	100

La Tabla 18-2 es una tabla de continuación de la Tabla 18-1

Tabla 18-2

IL6R-BP181/IL6R-L	B233D/P238D/P271G/K326A/A330K	108	362	150	170	122
IL6R-BP182/IL6R-L	B233D/P233D/P271G/Y296D/A330K	95	413	139	173	120
IL6R-BP183/IL6R-L	B233D/L234Y/P238D/P271G/K326A/A330K	83	423	191	164	113
IL6R-BP184/IL6R-L	B233D/P238D/P271G/A330K	96	436	131	171	106
IL6R-BP185/IL6R-L	B233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326A/A330K	47	670	446	179	191
IL6R-BP186/IL6R-L	B333D/L234Y/G337D/P238D/P271G/Y296D/K326A/A330K	43	614	368	175	143
IL6R-BP187/IL6R-L	L234Y/P238D/P271G/E326A/A330K	68	387	205	157	124
IL6R-BP188/IL6R-L	B233D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330K	74	636	234	179	121
IL6R-BP189/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	56	557	183	177	141
IL6R-BP190/IL6R-L	G337D/P238D/H268D/P271G/A330K	50	615	224	181	155
IL6R-BP191/IL6R-L	B233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	125	382	145	170	142
IL6R-BP192/IL6R-L	B233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	109	406	122	172	118
IL6R-BP193/IL6R-L	B233D/P238D/H268D/P271G/A330K	113	449	154	173	135
IL6R-BP194/IL6R-L	B233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	69	672	395	178	249
IL6R-BP195/IL6R-L	B233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	68	661	344	181	221
IL6R-BP196/IL6R-L	L234Y/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	89	402	195	157	137
IL6R-BP197/IL6R-L	B233D/L234Y/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/K326D/A330K	71	642	294	179	206
IL6R-BP198/IL6R-L	B233D/L234Y/P238D/H268D/P271G/E326A/A330K	104	449	188	164	157
IL6R-BP199/IL6R-L	B233D/P238D/K326D/A330R	112	172	116	144	103
IL6R-BP200/IL6R-L	B233D/L234Y/G237D/P238D/P271G/K326D/A330R	60	754	517	188	164
IL6R-BP201/IL6R-L	B233D/G237D/P238D/P271G/A330R	57	696	359	186	121
IL6R-BP202/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/K326A/A330R	43	615	285	185	108
IL6R-BP203/IL6R-L	G237D/P238D/P271G/A330R	35	637	255	185	88
IL6R-BP204/IL6R-L	B333D/P238D/P271G/K326A/A330R	110	301	137	165	121
IL6R-BP205/IL6R-L	B233D/P238D/P271G/Y296D/A330R	97	335	108	167	93
IL6R-BP206/IL6R-L	B233D/P238D/P271G/A330R	101	362	123	168	92
IL6R-BP207/IL6R-L	B233D/P238D/A330R	74	103	103	124	97
IL6R-BP208/IL6R-L	B333D/G237D/P238D/H268D/P271G/A330R	81	690	310	188	118
IL6R-BP209/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R	68	625	267	186	153
IL6R-BP210/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/A330R	57	661	279	187	135
IL6R-BP211/IL6R-L	B233D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330R	128	312	111	165	87
IL6R-BP212/IL6R-L	B233D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R	117	363	135	173	122
IL6R-BP213/IL6R-L	B233D/P238D/H268D/P271G/A330R	118	382	123	169	100
IL6R-BP214/IL6R-L	B233D/L234Y/G237D/P238D/Y296D/K326D/A330K	36	498	285	174	165

Los resultados de la medición de los valores de KD de las variantes mostradas en la Tabla 18 para los tipos FcγRIa, FcγRIIaR, FcγRIIaH, FcγRIIb y FcγRIIIaV por el método del ejemplo de referencia 2 se resumen en las Tablas 19-1 y 19-2. En la tabla, la alteración se refiere a la alteración introducida en IL6R-B3 (SEQ ID NO: 63). El molde usado para producir IL6R-B3, IL6R-G1d/IL6R-L, se indica con un asterisco (*). Además, KD (IIaR)/KD (IIb) y KD (IIaH)/KD (IIb) en la tabla representan respectivamente el valor obtenido dividiendo el valor de KD de la variante para FcγRIIaR entre el valor de KD de la variante para FcγRIIb, y el valor obtenido dividiendo el valor de KD de la variante para FcγRIIaH entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb. KD (IIb) del polipéptido original/KD (IIb) del polipéptido alterado se refiere al valor obtenido dividiendo el valor de KD del polipéptido original para FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb. Además, el valor de KD para la más fuerte de las actividades de unión a FcγRIIaR y FcγRIIaH de cada variante/valor de KD para la más fuerte de las actividades de unión a FcγRIIaR y FcγRIIaH del polipéptido original se muestra en las Tablas 19-1 y 19-2. Aquí el polipéptido original se refiere a la variante que tiene IL6R-B3 (SEQ ID NO: 63) como la cadena H. Se determinó que debido a la unión débil de FcγR a IgG, era imposible analizar con precisión por análisis cinético y, por lo tanto, los valores de las celdas sombreadas en gris en las Tablas 19-1 y 19-2 muestran valores calculados usando la ecuación 2 de ejemplo de referencia 2.

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

Las tablas 19-1 y 19-2 muestran que, en comparación con IL6R-B3, todas las variantes mostraban mejora de la afinidad por FcγRIIb, y el intervalo de mejora era de 3.0 veces a 99.0 veces. La relación del valor de KD de cada variante para FcγRIIaR/valor de KD de cada variante para FcγRIIb, y la relación del valor de KD de cada variante para FcγRIIaH/valor de KD de cada variante para FcγRIIb representan una actividad de unión a FcγRIIb en relación con la actividad de unión a FcγRIIaR y actividad de unión a FcγRIIaH, respectivamente. Es decir, esos valores muestran el grado de selectividad de unión de cada variante para FcγRIIb, y un valor mayor indica una mayor selectividad de unión para FcγRIIb. Puesto que la relación del valor de KD para FcγRIIaR/valor de KD para FcγRIIb, y la relación del valor de KD para FcγRIIaH/valor de KD para FcγRIIb del polipéptido original IL6R-B3/IL6R-L era 0.3 y 0.2, respectivamente, todas las variantes en las Tablas 19-1 y 19-2 mostraba mejora de la selectividad de unión para FcγRIIb en comparación con el polipéptido original. Cuando el valor de KD para la más fuerte de las actividades de unión a FcγRIIaR y FcγRIIaH de una variante/valor de KD para la más fuerte de las actividades de unión a FcγRIIaR y FcγRIIaH del polipéptido original es 1 o más, esto significa que la más fuerte de las actividades de unión a FcγRIIaR y FcγRIIaH de una variante tienen una unión equivalente o menor en comparación con la unión para la más fuerte de las actividades de unión a FcγRIIaR y FcγRIIaH del polipéptido original. Puesto que este valor era de 0.7 a 29.9 para las variantes obtenidas esta vez, se puede decir que la unión por la más fuerte de las actividades de unión a FcγRIIaR y FcγRIIaH de las variantes obtenidas esta vez era casi equivalente o disminuía en comparación con la del polipéptido original. Estos resultados mostraban que, en comparación con el polipéptido original, las variantes obtenidas esta vez han mantenido o disminuido las actividades de unión a FcγRIIa tipo R y tipo H, mejorado la actividad de unión a FcγRIIb y mejorado la selectividad para FcγRIIb. Además, en comparación con IL6R-B3, todas las variantes tenían menor afinidad por FcγRIa y FcγRIIIaV.

Tabla 19-1

[illegible]

La Tabla 19-2 es una tabla de continuación de la Tabla 19-1.

Tabla 19-2

IL6R-BP183	IL6R-L	E233D/L234Y/P236D/P271G/K326A/A330K	1.7E-08	2.5E-06	1.5E-05	2.4E-07	5.8E-06	10.7	62.5	12.9	9.3
IL6R-BP184	IL6R-L	E233D/P236D/P271G/A330K	1.1E-08	2.3E-06	3.0E-05	1.3E-07	6.8E-05	18.2	235.1	24.5	3.0
IL6R-BP185	IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P236D/P271G/K326A/A330K	6.3E-08	8.8E-07	7.3E-06	6.9E-08	3.8E-05	12.6	185.2	44.5	1.1
IL6R-BP186	IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P236D/P271G/Y296D/K326A/A330K	4.5E-08	9.8E-07	9.3E-06	6.1E-06	4.9E-05	15.8	152.5	50.7	1.3
IL6R-BP187	IL6R-L	E233D/L234Y/P236D/P271G/K326A/A330K	2.5E-08	2.8E-06	1.8E-05	2.9E-07	5.8E-05	9.7	62.3	10.7	3.6
IL6R-BP188	IL6R-L	E233D/G237D/P236D/H266D/P271G/A330K	2.1E-08	1.0E-06	1.6E-05	4.6E-06	5.8E-05	21.9	350.1	67.6	1.3
IL6R-BP189	IL6R-L	G237D/P236D/H266D/P271G/K326A/A330K	4.2E-08	1.4E-06	2.1E-05	7.4E-08	4.9E-05	18.5	283.8	41.8	1.8
IL6R-BP190	IL6R-L	E233D/P236D/H266D/P271G/A330K	6.3E-08	1.1E-06	1.7E-05	5.9E-08	4.5E-05	19.3	282.6	53.2	1.5
IL6R-BP191	IL6R-L	E233D/P236D/H266D/P271G/K326A/A330K	4.0E-09	3.0E-06	2.7E-05	1.5E-07	4.9E-05	20.3	184.9	21.3	3.8
IL6R-BP192	IL6R-L	E233D/P236D/H266D/P271G/Y296D/A330K	6.8E-09	2.6E-06	3.2E-05	1.1E-07	5.9E-05	23.1	283.2	27.3	3.4
IL6R-BP193	IL6R-L	E233D/P236D/H266D/P271G/A330K	6.3E-09	2.2E-06	2.5E-05	1.2E-07	5.2E-05	16.3	205.6	25.5	2.9
IL6R-BP194	IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P236D/H266D/P271G/K326A/A330K	2.4E-08	8.2E-07	8.5E-06	5.2E-06	2.7E-05	15.8	163.5	59.4	1.1
IL6R-BP195	IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P236D/H266D/P271G/Y296D/K326A/A330K	2.3E-08	9.1E-07	1.0E-05	5.0E-06	3.1E-05	18.2	200.8	62.0	1.2
IL6R-BP196	IL6R-L	L234Y/P236D/H266D/P271G/K326A/A330K	1.4E-08	3.0E-06	1.9E-05	2.2E-07	5.1E-05	13.4	85.2	13.9	5.9
IL6R-BP197	IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P236D/H266D/P271G/Y296D/K326A/A330K	1.9E-08	9.8E-07	1.2E-05	5.8E-08	3.3E-05	17.1	208.7	53.7	1.3
IL6R-BP198	IL6R-L	E233D/L234Y/P236D/H266D/P271G/K326A/A330K	1.1E-08	2.2E-05	2.0E-05	2.0E-07	4.4E-05	11.0	101.5	15.7	2.6
IL6R-BP199	IL6R-L	E233D/P236D/K326D/A330K	6.4E-09	8.6E-06	2.6E-05	4.9E-07	6.1E-05	17.5	53.0	6.3	11.1
IL6R-BP200	IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P236D/P271G/K326D/A330K	5.3E-08	6.3E-07	4.2E-06	3.4E-08	3.8E-05	18.5	123.9	91.2	0.8
IL6R-BP201	IL6R-L	E233D/G237D/P236D/P271G/A330K	5.1E-08	8.4E-07	6.9E-06	4.0E-08	5.2E-05	21.0	172.1	77.1	1.1
IL6R-BP202	IL6R-L	G237D/P236D/P271G/K326A/A330K	9.5E-08	1.2E-05	9.2E-06	6.4E-08	5.9E-05	19.2	144.0	48.4	1.6
IL6R-BP203	IL6R-L	G237D/P236D/P271G/A330K	1.8E-07	9.8E-07	1.1E-05	4.9E-08	7.2E-05	20.5	225.8	83.7	1.3
IL6R-BP204	IL6R-L	E233D/P236D/P271G/K326A/A330K	7.6E-09	4.6E-06	2.1E-05	2.9E-07	6.2E-05	17.6	82.7	12.2	5.8
IL6R-BP205	IL6R-L	E233D/P236D/P271G/Y296D/A330K	7.7E-09	3.5E-05	3.8E-05	1.6E-07	6.8E-05	21.6	175.1	19.4	4.5
IL6R-BP206	IL6R-L	E233D/P236D/P271G/A330K	8.2E-09	3.1E-05	2.4E-05	2.0E-07	6.8E-05	16.1	133.1	15.8	4.1
IL6R-BP207	IL6R-L	E233D/P236D/P271G/K326A/A330K	2.2E-08	1.9E-05	2.9E-05	8.4E-07	6.8E-05	23.0	34.5	3.7	25.1
IL6R-BP208	IL6R-L	E233D/G237D/P236D/H266D/P271G/A330K	1.9E-08	6.5E-07	8.3E-06	3.2E-08	5.3E-05	26.3	255.2	95.4	1.1
IL6R-BP209	IL6R-L	G237D/P236D/H266D/P271G/K326A/A330K	3.9E-08	1.2E-06	1.0E-05	5.1E-08	4.1E-05	22.7	195.3	60.4	1.5
IL6R-BP210	IL6R-L	G237D/P236D/P271G/A330K	6.5E-06	1.0E-05	9.5E-06	3.9E-08	4.6E-05	25.4	241.1	78.4	1.3
IL6R-BP211	IL6R-L	E233D/P236D/H266D/P271G/K326A/A330K	4.3E-09	4.1E-06	2.7E-05	2.2E-07	7.3E-05	18.3	120.3	13.8	5.4
IL6R-BP212	IL6R-L	E233D/P236D/H266D/P271G/Y296D/A330K	5.2E-09	5.5E-06	2.2E-05	1.7E-07	5.2E-05	21.1	133.3	18.7	4.5
IL6R-BP213	IL6R-L	E233D/P236D/H266D/P271G/A330K	4.1E-09	3.1E-06	2.4E-05	1.8E-07	6.3E-05	17.7	135.4	17.5	4.0
IL6R-BP214	IL6R-L	E233D/L234Y/G237D/P236D/Y296D/K326D/A330K	5.9E-08	1.7E-06	9.2E-06	1.2E-07	3.2E-05	14.5	78.0	26.2	2.2

Ejemplo 13. Preparación de variantes con unión a FcγRIIb mejorada

Como se muestra en el ejemplo 8, cuando se mejora la unión a FcγRIIb, es preferible que la unión a FcγRIIb mejore a la vez que se suprime la unión a otros FcγR activantes. Por lo tanto, los autores de la presente invención produjeron adicionalmente variantes con unión a FcγRIIb mejorada o selectividad mejorada a FcγRIIb combinando alteraciones que mejoran la unión a FcγRIIb o mejorando la selectividad para FcγRIIb. Específicamente, las alteraciones descritas

en los ejemplos 9, 11 y 12 que se encontró que eran efectivas cuando se combinaban con la alteración P238D, se combinaron entre sí, basándose en la alteración P238D que mostraba el excelente efecto para mejorar la unión a FcγRIIb y mejorar la selectividad para FcγRIIb.

Las variantes se produjeron combinando las regiones Fc de IL6R-G1d (SEQ ID NO: 54) e IL6R-B3 (SEQ ID NO: 63) con las alteraciones E233D, L234Y, G237D, S267Q, H268D, P271G, Y296D, K326D, K326A, A330R y A330K descritas en los ejemplos 9, 11 y 12, que se descubrió que eran efectivas cuando se combinaban con la alteración P238D. Usando IL6R-L (SEQ ID NO: 56) como la cadena L del anticuerpo, los anticuerpos que comprenden las variantes descritas antes en la cadena pesada se expresaron y purificaron según el método descrito en el ejemplo de referencia 1. Las variantes resultantes se evaluaron respectivamente para determinar la unión a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIaH, FcγRIIaR, FcγRIIb o FcγRIIIaV) por el método descrito en el ejemplo de referencia 2.

La KD de cada variante para cada FcγR se muestra en la Tabla 20. "Alteración" se refiere a una alteración introducida en IL6R-B3 (SEQ ID NO: 63). IL6R-B3/IL6R-L, que se usa como molde para producir cada variante, se indica con un asterisco (*). "KD (IIaR)/KD (IIb)" en la tabla muestra el valor obtenido dividiendo la KD de cada variante para FcγRIIaR entre la KD de cada variante para FcγRIIb. Cuanto mayor es el valor, mayor es la selectividad para FcγRIIb. "KD (IIb) del polipéptido original/KD (IIb) del polipéptido alterado" muestra el valor obtenido dividiendo el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb. Por otro lado, "KD (IIaR) del polipéptido original/KD (IIaR) del polipéptido alterado" muestra el valor obtenido dividiendo el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para FcγRIIaR entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIaR. En la Tabla 20, el número en las celdas sombreadas de gris indica que se concluyó que la unión de FcγR a IgG era demasiado débil para analizar correctamente por análisis cinético y, por lo tanto, se calculó usando:

Ecuación 2

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

descrita en el ejemplo de referencia 2.

Tabla 20

NOMBRE DE VARIANTE	ALTERACIÓN	KD FRENTE A FcγRIIa (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIaR (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIaH (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIaV (mol/L)	KD (IIaR)/KD (IIb)	KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/ KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO	KD(IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/ KD(IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO
IL6R-G1d/IL6R-L		3.20E-10	1.00E-06	6.70E-07	2.60E-06	3.50E-07	1.2	1.1
IL6R-B3/IL6R-L	*	4.20E-10	1.10E-06	7.70E-07	3.10E-06	3.30E-07	0.3	1
IL6R-BP215/IL6R-L	P238D	1.10E-08	1.50E-05	4.30E-05	1.20E-06	7.10E-05	12.5	2.6
IL6R-BP216/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	4.30E-08	1.30E-06	1.40E-05	4.10E-08	6.70E-05	31.7	75.6
IL6R-BP222/IL6R-L	G237D/P238D/S267Q/H268D/P271G/Y296D/A330K	6.20E-07	2.90E-06	2.50E-05	1.40E-07	5.30E-05	20.7	22.1
IL6R-BP218/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	2.80E-06	3.50E-06	2.80E-06	1.50E-07	6.00E-05	24	20.7
IL6R-BP219/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330K	3.70E-08	1.50E-06	1.50E-05	7.60E-08	3.80E-05	19.7	40.8
IL6R-BP220/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	4.60E-08	5.10E-07	3.30E-06	3.40E-08	7.90E-05	17.9	91.2
IL6R-BP221/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	2.00E-08	1.10E-06	1.30E-05	3.60E-08	5.80E-05	30.6	86.1
IL6R-BP222/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	1.30E-07	7.10E-07	2.50E-06	2.80E-08	4.80E-05	25.4	110.7
IL6R-BP223/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	5.10E-08	7.10E-07	2.50E-06	3.40E-08	1.70E-05	20.9	91.2
IL6R-BP224/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	2.70E-08	5.00E-07	2.30E-06	2.50E-08	3.20E-05	24	124
IL6R-BP225/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	6.20E-09	4.50E-07	3.50E-06	3.50E-08	4.10E-05	12.9	88.6
IL6R-BP226/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330K	9.50E-08	5.90E-07	2.30E-06	3.50E-08	3.40E-05	19.7	88.6
IL6R-BP227/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330K	5.20E-08	5.70E-07	2.10E-06	3.30E-08	3.60E-05	17.3	93.9
IL6R-BP228/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330K	2.70E-08	5.20E-07	3.00E-06	3.20E-08	2.60E-05	19.4	96.9
IL6R-BP229/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	5.30E-09	4.20E-07	1.10E-05	4.00E-08	5.20E-05	10.5	77.5
IL6R-BP230/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	5.60E-08	8.10E-07	3.30E-06	4.20E-08	3.70E-05	19.5	73.8
IL6R-BP231/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	1.40E-08	5.70E-07	5.30E-06	2.10E-08	6.70E-05	27.1	147.6
IL6R-BP232/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	9.40E-09	7.40E-07	1.10E-05	2.30E-08	4.00E-05	32.2	134.8
IL6R-BP233/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326A/A330K	7.60E-08	8.40E-07	3.30E-06	5.60E-08	4.50E-05	15	55.4
IL6R-BP234/IL6R-L	G237D/P238D/H268D/P271G/K326D/A330K	7.00E-08	5.90E-07	2.30E-06	3.70E-08	5.10E-05	18.6	83.8
IL6R-BP235/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	6.50E-09	1.20E-06	2.30E-05	1.20E-07	3.10E-05	10	25.8
IL6R-BP236/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	3.50E-09	6.80E-07	7.30E-06	4.40E-08	3.50E-05	15.5	70.5
IL6R-BP237/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	7.70E-09	8.40E-07	1.90E-05	6.50E-08	5.90E-05	12.9	47.7
IL6R-BP238/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	4.10E-09	1.10E-06	1.90E-05	1.00E-07	3.30E-05	11	31
IL6R-BP239/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	2.40E-09	5.40E-07	7.70E-06	3.60E-08	2.70E-05	17.8	86.1
IL6R-BP240/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	7.60E-09	8.10E-07	1.70E-05	6.00E-08	4.90E-05	13.5	51.7
IL6R-BP241/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	7.60E-09	1.50E-06	2.60E-05	9.50E-08	5.20E-05	15.8	32.6
IL6R-BP242/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	1.10E-09	5.80E-07	9.00E-06	4.50E-08	3.10E-05	15.1	68.9
IL6R-BP243/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	1.90E-09	7.50E-07	8.50E-06	5.10E-08	3.90E-05	14.7	60.8
IL6R-BP244/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	3.00E-09	5.40E-07	6.30E-06	3.60E-08	3.50E-05	15	86.1
IL6R-BP245/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	7.80E-09	1.80E-06	3.30E-05	1.10E-07	4.60E-05	16.4	28.2
IL6R-BP246/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	6.30E-09	1.40E-06	2.30E-05	8.30E-08	3.90E-05	16.9	37.3
IL6R-BP247/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	8.00E-09	1.60E-06	2.30E-05	9.20E-08	4.40E-05	17.4	33.7
IL6R-BP248/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	7.50E-09	8.10E-07	1.20E-05	3.70E-08	1.40E-05	21.9	83.8
IL6R-BP249/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	1.70E-09	8.20E-07	1.10E-05	3.50E-08	1.40E-05	23.4	88.6
IL6R-BP250/IL6R-L	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330K	7.00E-09	5.20E-07	7.30E-06	3.70E-08	2.80E-05	16.8	83.8

Cuando se considera la unión a cada FcγR por IL6R-B3/IL6R-L que resulta de introducir la alteración K439E en IL6R-G1d/IL6R-L que contiene la secuencia de IgG1 humana natural como 1, la unión de IL6R-G1d/IL6R-L a FcγRIa es 1.3

veces; la unión de IL6R-G1d/IL6R-L a FcγRIIaR era 1.1 veces; la unión de IL6R-G1d/IL6R-L a FcγRIIaH era de 1.1 veces, la unión de IL6R-G1d/IL6R-L a FcγRIIb era de 1.2 veces, y la unión de IL6R-G1d/IL6R-L a FcγRIIIaV era 0.9 veces. Por lo tanto, para cualquier tipo de FcγR dado, la unión de IL6R-B3/IL6R-L a FcγR era comparable a la unión de IL6R-G1d/IL6R-L a FcγR. Por lo tanto, se asume que la comparación de la unión de cada variante a cada FcγR con la de IL6R-B3/IL6R-L antes de la introducción de la alteración es equivalente a la comparación de la unión de cada variante a cada FcγR con la unión a cada FcγR por IL6R-G1d/IL6R-L que contiene la secuencia de IgG1 humana natural. Por esta razón, en los siguientes ejemplos a continuación, la actividad de unión de cada variante a cada FcγR se comparará con aquella a cada FcγR por IL6R-B3/IL6R-L antes de la introducción de la alteración. La Tabla 20 muestra que todas las variantes tienen mayor actividad de unión a FcγRIIb en comparación con IL6R-B3 antes de la introducción de la alteración. La actividad de unión de IL6R-BF648/IL6R-L, que era la más baja, aumentó 2.6 veces, mientras que la actividad de unión de IL6R-BP230/IL6R-L, que es la más alta, aumentó 147.6 veces. En cuanto al valor de KD (IIaR)/KD (IIb) que representa la selectividad, el valor para IL6R-BP234/IL6R-L, que era el más bajo, era 10.0, mientras que el valor para IL6R-BP231/IL6R-L, que era el más alto, era 32.2. En comparación con 0.3 para IL6R-B3/IL6R-L antes de introducir la alteración, estos valores implican que todas las variantes tienen selectividad mejorada. Todas las variantes mostraban una actividad de unión menor a FcγRIa, FcγRIIaH y FcγRIIIaV que la de IL6R-B3/IL6R-L antes de introducir la alteración.

Ejemplo 14. Análisis de la estructura cristalina de rayos X de los complejos de la región extracelular de FcγRIIb o la región extracelular de FcγRIIaR y la región Fc con unión mejorada a FcγRIIb

Como se muestra en el ejemplo 13, la unión a FcγRIIb de la variante IL6R-BP230/IL6R-L, cuya unión a FcγRIIb era la más mejorada, se mejoró aproximadamente 150 veces en comparación con IL6R-B3/IL6R-L antes de introducir la alteración, mientras que la mejora de su unión a FcγRIIaR se suprimió en un grado de aproximadamente 1.9 veces. Por lo tanto, IL6R-BP230/IL6R-L es una variante excelente tanto en la unión a FcγRIIb como en la selectividad. Sin embargo, los autores de la presente invención buscaron la posibilidad de crear variantes más preferibles con una unión a FcγRIIb más mejorada a la vez que se suprimía la unión a FcγRIIaR según sea posible.

Como se muestra en la Fig. 25 descrita en el Ejemplo 10, en la región Fc con alteración P238D, el Asp en la posición 270 (numeración EU) en su dominio B de CH2 forma una interacción electrostática estrecha con la Arg en la posición 131 en FcγRIIb. Este resto de aminoácido en la posición 131 es His en FcγRIIIa y FcγRIIaH, mientras que es Arg en FcγRIIaR como en FcγRIIb. Por lo tanto, no hay diferencia entre FcγRIIaR y FcγRIIb en términos de la interacción del resto de aminoácido en la posición 131 con Asp en la posición 270 (numeración EU) en el dominio B de CH2. Esto se supone que es un factor importante para la baja selectividad entre la unión a FcγRIIb y la unión a FcγRIIaR de la región Fc.

Por otro lado, las regiones extracelulares de FcγRIIa y FcγRIIb son 93% idénticas en la secuencia de aminoácidos, y por lo tanto tienen homología muy alta. Basándose en el análisis de la estructura cristalina del complejo de la región Fc de IgG1 natural (en sucesivo abreviado como Fc (WT)) y la región extracelular de FcγRIIaR (*J. Immunol.* (2011) 187, 3208-3217), una diferencia encontrada alrededor de la interfase entre los dos que interaccionan entre sí era de solo tres aminoácidos (Gln127, Leu132, Phe160) entre FcγRIIaR y FcγRIIb. Por lo tanto, los autores de la presente invención predijeron que era extremadamente difícil mejorar la selectividad de la región Fc entre la unión a FcγRIIb y la unión a FcγRIIaR.

En este contexto, los autores de la presente invención concibieron que, para mejorar más la actividad de unión a FcγRIIb de la región Fc, y para mejorar la selectividad de las regiones Fc entre la unión a la unión a FcγRIIb y FcγRIIaR, era importante aclarar diferencias sutiles entre la interacción región Fc-FcγRIIb y la interacción región Fc-FcγRIIaR analizando no solo la estructura tridimensional del complejo de la región Fc con unión a FcγRIIb mejorada y la región extracelular de FcγRIIb sino también la estructura tridimensional del complejo del región Fc con unión a FcγRIIb mejorada y la región extracelular de FcγRIIaR. Primero, los autores de la presente invención analizaron la estructura cristalina de rayos X del complejo de la región extracelular de FcγRIIb o FcγRIIaR y Fc (P208) que resulta de eliminar la alteración K439E de la región Fc de IL6R-BP208/IL6R-L creada como se describe en ejemplo 12, que era la variante usada como base en la producción de IL6R-BP230/IL6R-L.

(14-1) Análisis de la estructura cristalina de rayos X del complejo de Fc (P208) y la región extracelular de FcγRIIb

Expresión y purificación de Fc (P208)

Fc (P208) se preparó como se describe a continuación. Primero, se produjo IL6R-P208 sustituyendo la Lys por Glu en la posición 439 (numeración EU) en IL6R-BP208, como es el caso de la secuencia de IgG1 humana natural. Después, se clonó la secuencia génica de Fc (P208), que se clonó por PCR desde el Glu en la posición 216 (numeración EU) al C terminal usando como molde un ADN que codifica una variante con una sustitución de Cys por Ser en la posición 220 (UE numeración). La construcción del vector de expresión, la expresión y la purificación se lograron de acuerdo con el método descrito en el ejemplo de referencia 1. Por otro lado, la Cys en la posición 220 (numeración EU) en la IgG1 ordinaria forma un enlace disulfuro con un Cys en la cadena L. Cuando se prepara la región Fc sola, la cadena L no se coexpresa. Por lo tanto, la Cys en la posición 220 se sustituyó por Ser para evitar la formación innecesaria de enlaces disulfuro.

Expresión y purificación de la región extracelular de FcγRIIb.

La región extracelular de FcγRIIb se preparó de acuerdo con el método descrito en el ejemplo de referencia 2.

Purificación del complejo de Fc (P208D)/región extracelular de FcγRIIb

A 0.15 mg del producto purificado de Endo F1 (*Protein Science* (1996) 5, 2617-2622) expresado en *E. coli* como una proteína de fusión con glutatión S-transferasa se añadieron 1.5 mg de una muestra de cristalización de la región extracelular de FcγRIIb. Esta muestra añadida en tampón Bis-Tris 0.1 M (pH 6.5) se dejó reposar a temperatura ambiente durante tres días para escindir las cadenas de azúcar de tipo N, excepto la N-acetilglucosamina directamente unida a la Asn en la muestra de la región extracelular de FcγRIIb. Después, la muestra de la región extracelular de FcγRIIb sometida al tratamiento de escisión de la cadena de azúcar se concentró con un filtro de ultrafiltración de MWCO 5000 y se purificó por cromatografía con una columna de filtración en gel (Superdex200 10/300) equilibrada con HEPES 20 mM (pH 7.5)/NaCl 0.1 M. Además, a la fracción de región extracelular de FcγRIIb purificada con sus cadenas de azúcar escindidas, se añadió Fc (P208) de modo que la relación molar de la región extracelular de FcγRIIb estaría presente en un ligero exceso. La mezcla concentrada por ultrafiltración con MWCO de 10.000 se purificó por cromatografía con una columna de filtración en gel (Superdex200 10/300) equilibrada con HEPES 25 mM (pH 7.5), NaCl 0.1 M. La fracción purificada preparada como se ha descrito antes se usó como una muestra del complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIb en la evaluación posterior.

Cristalización del complejo de Fc (P208D)/región extracelular de FcγRIIb

Una muestra de complejo de Fc (P208D)/región extracelular de FcγRIIb concentrada a aproximadamente 10 mg/ml con un filtro de ultrafiltración de MWCO 10000 se cristalizó usando el método de difusión de vapor de gota colgante en combinación con el método de siembra. Se usó la placa VDXm (Hampton Research) para la cristalización. Usando una solución de depósito de Bis-Tris 0.1 M (pH 6.5), PEG3350 al 19% (p/v), fosfato de potasio dibásico 0.2 M, se prepararon gotas de cristalización en una relación de mezcla de solución de depósito: muestra de cristalización = 0.85 µl:0.85 µl. Los cristales del complejo obtenido en condiciones similares se trituraron con Seed Bead (Hampton Research) para preparar una solución de cristal semilla. Las gotas de cristalización se añadieron con 0,15 µl de una solución diluida preparada a partir de la solución de semilla y se dejaron reposar a 20°C en pocillos de depósito sellados. Esto produjo cristales en forma de placa.

Mediciones de datos de difracción de rayos X de un cristal complejo de Fc (P208D)/región extracelular de FcγRIIb

Un monocristal de complejo de Fc (P208D)/región extracelular de FcγRIIb preparado como se ha descrito antes se sumergió en una solución de Bis-Tris 0.1 M (pH 6.5), PEG3350 al 24% (p/v), fosfato de potasio dibásico 0.2 M, etilenglicol al 20% (v/v). Después, el monocristal se sacó de la solución usando un alfiler con un diminuto lazo de nylon y se congeló en nitrógeno líquido. Los datos de difracción de rayos X del monocristal se recogieron en Spring-8 BL32XU. Durante la medición, el cristal se puso constantemente en una corriente de nitrógeno a -178°C para mantenerlo en un estado congelado. Se recogieron un total de 300 imágenes de difracción de rayos X del monocristal usando el detector CCD MX-225HE (RAYONIX) conectado a una línea de haz con rotación del monocristal de 0.6° cada vez. Basándose en las imágenes de difracción obtenidas, la determinación de las constantes de la red, la indexación de manchas de difracción y el procesamiento de datos de difracción se llevaron a cabo usando los programas Xia2 (*J. Appl. Cryst.* (2010) 43, 186-190), paquete XDS (*Acta Cryst.* (2010) D66, 125-132) y Scala (*Acta Cryst.* (2006) D62, 72-82). Finalmente, se obtuvieron los datos de intensidad de difracción del monocristal hasta una resolución de 2.81 Å. El cristal pertenece al grupo espacial C222₁ con constantes de red $a = 156.69$ Å, $b = 260.17$ Å, $c = 56.85$ Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$ y $\gamma = 90^\circ$.

Análisis de la estructura cristalina de rayos X del complejo de Fc (P208D)/región extracelular de FcγRIIb

La estructura del complejo de Fc (P208D)/región extracelular de FcγRIIb se determinó mediante un método de reemplazo molecular usando el programa Phaser (*J. Appl. Cryst.* (2007) 40, 658-674). Se estimó que el número de complejos en una unidad asimétrica era uno del tamaño de la red cristalina obtenida y el peso molecular del complejo de Fc (P208D)/región extracelular de FcγRIIb. Las porciones de restos de aminoácidos de las posiciones A 239-340 de la cadena y las posiciones 239-340 de la cadena B, que se sacaron como una coordenada separada de la coordenada estructural del código PDB: 3SGJ para la estructura cristalina del complejo de Fc (WT)/región extracelular de FcγRIIb, se usaron respectivamente como modelos para buscar el dominio CH2 de la región Fc. Asimismo, las porciones de restos de aminoácidos de las posiciones 341-444 de la cadena A y las posiciones 341-443 de la cadena B, que se tomaron como una sola coordenada de la coordenada estructural del código PDB: 3SGJ, se usaron como modelo para buscar el dominio CH3 de la región Fc. Finalmente, las porciones de restos de aminoácidos de las posiciones 6-178 de la cadena A, que se tomaron de la coordenada estructural del código PDB: 2FCB para la estructura cristalina de la región extracelular de FcγRIIb, se usaron como modelo para buscar Fc (P208). Los autores de la presente invención intentaron determinar las orientaciones y posiciones de los respectivos modelos de búsqueda del dominio CH3 de la región Fc, la región extracelular de FcγRIIb y el dominio CH2 de la región Fc en las redes cristalinas basándose en la función de rotación y la función de traducción, pero no pudieron determinar la posición de uno de los dominios CH2. Después, con referencia a la estructura cristalina del complejo de Fc (WT)/región extracelular de FcγRIIb, la posición del último dominio A de CH2 se determinó basándose en un mapa de densidad electrónica que se calculó basándose en fase determinada a partir de las tres partes restantes. Por lo tanto, los autores de la presente invención obtuvieron un modelo inicial para la estructura cristalina del complejo de Fc (P208D)/región

extracelular de FcγRIIb. El valor del factor R de fiabilidad cristalográfica del modelo estructural para los datos de intensidad difractada a 25 a 3.0 Å era 42.6% y el valor R libre era 43.7% después del refinamiento del cuerpo rígido del modelo estructural inicial obtenido que mueve los dos dominios CH2 y dos dominios CH3 de la región Fc, y la región extracelular de FcγRIIb. Después, el refinamiento del modelo estructural se logró repitiendo el refinamiento estructural usando el programa REFMAC5 (*Acta Cryst.*(2011) D67, 355-367) seguido de la revisión del modelo estructural realizado usando el programa Coot (*Acta Cryst.* (2010) D66, 486-501) con referencia a los mapas de densidad electrónica donde se calcularon los coeficientes 2Fo-Fc y Fo-Fc usando el factor estructural Fo determinado experimentalmente, la región Fc del factor estructural calculada de acuerdo con el modelo estructural y las fases calculadas de acuerdo con el modelo estructural. Finalmente, como resultado de la incorporación de moléculas de agua en el modelo basado en los mapas de densidad electrónica que usan 2Fo-Fc o Fo-Fc como coeficiente, y el siguiente refinamiento, el factor de fiabilidad cristalográfica, los valores R y el valor R libre del modelo que contenía 4786 átomos que no son de hidrógeno se convirtió en 24.5% y 28.2% para 27259 datos de intensidad de difracción de 25 Å a 2.81 Å de resolución, respectivamente.

La estructura tridimensional del complejo de Fc (P208D)/región extracelular de FcγRIIb se determinó a una resolución de 2.81 Å por análisis estructural. La estructura obtenida por el análisis se muestra en la Fig. 30. Se puso de manifiesto que la región extracelular de FcγRIIb estaba unida entre los dos dominios CH2 de la región Fc, que se parece a las estructuras tridimensionales de los complejos previamente analizados de Fc (WT), que es el Fc de la IgG natural, y cada una de las regiones extracelulares de FcγRIIIa (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2011) 108, 12669-126674), FcγRIIIb (*Nature* (2000) 400, 267-273; *J. Biol. Chem* (2011) 276, 16469-16477) y FcγRIIa (*J. Immunol.* (2011) 187 (6), 3208-3217).

Una observación de cerca del complejo de Fc (P208D)/región extracelular de FcγRIIb puso de manifiesto un cambio en la estructura del bucle en las posiciones 233 a 239 (numeración EU) después de la región bisagra en el dominio A de CH2 de la región Fc debido a una influencia de las alteraciones G237D y P238D introducidas en comparación con el complejo de Fc (WT)/región extracelular de FcγRIIIaR (Fig. 31). Esto conduce a que la cadena principal de Asp en la posición 237 (numeración EU) en Fc (P208) formaba un enlace de hidrógeno estrecho con la cadena lateral de Tyr en la posición 160 en FcγRIIb (Fig. 32). Tanto en FcγRIIIaH como en FcγRIIIaR, el resto de aminoácido en la posición 160 es Phe, que es incapaz de formar dicho enlace de hidrógeno. Esto sugiere que el enlace de hidrógeno descrito antes tiene una contribución importante a la mejora de la unión a FcγRIIb y la adquisición de la selectividad frente a la unión a FcγRIIIa de Fc (P208), es decir, mejora de la actividad de unión a FcγRIIb y reducción de la actividad de unión a FcγRIIIa de Fc (P208).

Por otro lado, la cadena lateral de Asp en la posición 237 (numeración EU) en Fc (P208) no forma una interacción particularmente significativa en la unión a FcγRIIb ni interacción con otros restos dentro de la región Fc. La Ile en la posición 332, Glu en la posición 333 y Lys en la posición 334 (numeración EU) en la región Fc se encuentran cerca del Asp en la posición 237 (numeración EU) (Fig. 33). Cuando los restos de aminoácidos de estas posiciones se sustituyen por restos hidrófilos para formar una interacción con la cadena lateral del Asp en la posición 237 (numeración EU) en Fc (P208) y la estructura del bucle puede estabilizarse por la interacción, esto puede conducir a reducción de la pérdida de energía entrópica debido al enlace de hidrógeno entre la región Fc y la Tyr en la posición 160 en FcγRIIb y, por lo tanto, a un aumento en la energía libre de unión, es decir, un aumento en la actividad de unión.

Cuando la estructura cristalina de rayos X del complejo de Fc (P238D) con la alteración P238D y la región extracelular de FcγRIIb descrita en el Ejemplo 10 se compara con la estructura cristalina de rayos X del complejo de Fc (P208) y la región extracelular de FcγRIIb, se observan alteraciones en cinco porciones en Fc (P208) en comparación con Fc (P238D) y la mayoría de los cambios se observan solo a nivel de la cadena lateral. Por otro lado, también se observa una desviación posicional a nivel de la cadena principal debido a la alteración de Pro-a-Gly en la posición 271 (numeración EU) en el dominio CH2 de B de la región Fc, y además hay un cambio estructural en el bucle en las posiciones 266 a 270 (numeración EU) (Fig. 34). Como se describe en el ejemplo 11, se sugiere que, cuando el Asp en la posición 270 (numeración EU) en Fc (P238D) forma una interacción electrostática estrecha con la Arg en la posición 131 en FcγRIIb, la interacción puede inducir estrés estereoquímico en la Pro en la posición 271 (numeración EU). El experimento descrito en la presente memoria sugiere que se supone que el cambio estructural observado con la alteración de Gly para el aminoácido en la posición 271 (numeración EU) es el resultado de la eliminación de la distorsión estructural acumulada en la Pro antes de la alteración y la eliminación da como resultado un aumento en la energía libre para la unión a FcγRIIb, es decir, un aumento en la actividad de unión.

Además, se demostró que, debido al cambio de la estructura de bucle en las posiciones 266 a 271 (numeración EU), la Arg en la posición 292 (numeración EU) experimentaba un cambio estructural con dos estados. En este caso, se sugiere que la interacción electrostática (Fig. 34) formada entre la Arg en la posición 292 (numeración EU) y el Asp en la posición 268 (numeración EU) que es un resto alterado en Fc (P208) puede contribuir a la estabilización de la estructura de bucle. Puesto que la interacción electrostática formada entre el Asp en la posición 270 (numeración EU) en el bucle y la Arg en la posición 131 en FcγRIIb contribuye en gran medida a la actividad de unión de Fc (P208) a FcγRIIb, era probable la estabilización de la estructura del bucle en la conformación de unión redujera la pérdida de energía entrópica tras la unión. Por lo tanto, se espera que la alteración de como resultado un aumento en la energía libre de unión, es decir, un aumento en la actividad de unión.

Además, se analizó la posibilidad de alteración para aumentar la actividad basándose en el resultado del análisis

estructural. Se encontró la Ser en la posición 239 (numeración EU) como candidata para el sitio para introducir alteración. Como se muestra en la Fig. 35, la Ser en la posición 239 (numeración EU) en el dominio CH2 de B está presente en la posición hacia la cual la Lys en la posición 117 en FcγRIIb se extiende más naturalmente en la estructura. Sin embargo, puesto que la densidad electrónica no se observó para la Lys en la posición 117 en FcγRIIb por el análisis descrito antes, la Lys no tiene una estructura definida. En esta situación, es probable que la Lys117 tenga solo un efecto limitado en la interacción con Fc (P208). Cuando la Ser en la posición 239 (numeración EU) en el dominio CH2 de B se sustituye por Asp o Glu cargados negativamente, se espera que dicha alteración produzca una interacción electrostática con la Lys cargada positivamente en la posición 117 en FcγRIIb, lo da como resultado la mejora de la actividad de unión a FcγRIIb.

Por otro lado, una observación de la estructura de la Ser en la posición 239 (numeración EU) en el dominio A de CH2 puso de manifiesto que, al formar un enlace de hidrógeno con la cadena principal de la Gly en la posición 236 (numeración EU), la cadena lateral de esta Ser estabilizaba la estructura del bucle en las posiciones 233 a 239, incluyendo el Asp en la posición 237 (numeración EU) que forma un enlace de hidrógeno con la cadena lateral de la Tyr en la posición 160 en FcγRIIb, después de la región bisagra (Fig. 32). La estabilización de la estructura de bucle en la conformación de unión puede reducir la pérdida de energía entrópica tras la unión y dar como resultado un aumento en la energía libre de unión, es decir, una mejora de la actividad de unión. Por otro lado, cuando la Ser en la posición 239 (numeración EU) en el dominio CH2 de A se sustituye por Asp o Glu, la estructura del bucle puede volverse inestable debido a la pérdida del enlace de hidrógeno con la cadena principal de Gly en la posición 236 (numeración EU). Además, la alteración puede dar como resultado una repulsión electrostática del Asp en la posición 265 (numeración EU) en las proximidades, conduciendo a una mayor desestabilización de la estructura del bucle. La energía para la desestabilización corresponde a la pérdida de energía libre para la unión a FcγRIIb, lo que puede dar como resultado una reducción en la actividad de unión.

(14-2) Análisis de la estructura cristalina de rayos X del complejo de Fc (P208) y región extracelular de FcγRIIIaR

Expresión y purificación de la región extracelular de FcγRIIIaR.

La región extracelular de FcγRIIIaR se preparó de acuerdo con el método descrito en el ejemplo de referencia 2.

Purificación del complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIIa tipo R

Se añadieron 1.5 mg de muestra purificada de la región extracelular de FcγRIIIaR a 0.15 mg del producto purificado de Endo F1 (*Protein Science* (1996) 5, 2617-2622) expresado en *E. coli* como una proteína de fusión con S-transferasa, 20 μl de Endo F2 5 U/ml (QA-bio) y 20 μl de Endo F3 5 U/ml (QA-bio). Después de 9 días de incubación a temperatura ambiente en tampón de acetato de Na 0.1 M (pH 4.5), se añadió a la muestra adicionalmente 0.07 mg del Endo F1 descrito antes, 7.5 μl del Endo F2 descrito antes y 7.5 μl del Endo F3 descrito antes, y se incubó durante tres días para escindir las cadenas de azúcar de tipo N, excepto la N-acetilglucosamina directamente unida a la Asn en la muestra de la región extracelular de FcγRIIIaR. Después, la muestra de la región extracelular de FcγRIIIaR concentrada con un filtro de ultrafiltración de MWCO 10000 y sometida al tratamiento de escisión de la cadena de azúcar descrito antes se purificó por cromatografía con una columna de filtración en gel (Superdex200 10/300) equilibrada con HEPES 25 mM (pH 7), NaCl 0.1 M. A continuación, a la fracción de región extracelular de FcγRIIIaR purificada con sus cadenas de azúcar escindidas, se añadió Fc (P208) de modo que la relación molar de la región extracelular de FcγRIIb estaría presente en un ligero exceso. La mezcla concentrada por ultrafiltración con MWCO 10 000 se purificó por cromatografía con una columna de filtración en gel (Superdex200 10/300) equilibrada con HEPES 25 mM (pH 7), NaCl 0.1 M. La fracción purificada preparada como se ha descrito antes se usó como una muestra del complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIIa tipo R en la evaluación posterior.

Cristalización del complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIIa tipo R

Una muestra de complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIIa tipo R concentrada a aproximadamente 10 mg/ml con un filtro de ultrafiltración de MWCO 10000 se cristalizó usando el método de difusión de vapor de gota sedente. Usando una solución de depósito de Bis-Tris 0.1 M (pH 7.5), PEG3350 al 26% (p/v), sulfato de amonio 0.2 M, se prepararon gotas de cristalización en una proporción de mezcla de solución de depósito: muestra de cristalización = 0.8 μl: 1.0 μl. Las gotas se sellaron herméticamente y se dejaron reposar a 20°C. Esto produjo cristales en forma de placas.

Medición de datos de difracción de rayos X del cristal del complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIIaR

Un monocristal de complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIIaR preparado como se ha descrito antes se sumergió en una solución de Bis-Tris 0.1 M (pH 7.5), PEG3350 al 27.5% (p/v), sulfato de amonio 0.2 M, glicerol al 20% (v/v). Después, el cristal se sacó de la solución usando un alfiler con un diminuto lazo de nylon y se congeló en nitrógeno líquido. Los datos de difracción de rayos X del monocristal se recogieron en la instalación de radiación sincrotrón Photon Factory BL-17A en la Organización de Investigación de Altas Energías con Aceleradores. El cristal se colocó constantemente en una corriente de nitrógeno a -178°C para mantenerlo congelado durante la medición. Se recogieron un total de 225 imágenes de difracción de rayos X del monocristal usando el detector CCD Quantum 315r (ADSC) equipado en la línea del haz con rotación del monocristal a 0.6° cada vez. Basándose en las imágenes de difracción obtenidas, la determinación de constantes de la red, la indexación de manchas de difracción y el

procesamiento de datos de difracción se llevaron a cabo usando los programas Xia2 (*J. Appl. Cryst.* (2010) 43, 186-190), paquete XDS (*Acta Cryst.* (2010) D66, 125-132) y Scala (*Acta Cryst.* (2006) D62, 72-82). Finalmente, se obtuvieron datos de intensidad de difracción de hasta 2.87 Å de resolución. El cristal pertenece al grupo espacial C2221 con constantes de red $a = 154.31$ Å, $b = 257.61$ Å, $c = 56.19$ Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$ y $\gamma = 90^\circ$.

5 Análisis de la estructura cristalina de rayos X del complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIIa tipo R

La estructura del complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIIa tipo R se determinó por un método de reemplazo molecular usando el programa Phaser (*J. Appl. Cryst.* (2007) 40, 658-674). El número de complejos en una unidad asimétrica se estimó que era uno del tamaño de la red cristalina obtenida y el peso molecular del complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIIaR. Usando, como modelo de búsqueda, la estructura cristalográfica del complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIIb obtenida como se describe en el ejemplo (14-1), la orientación y posición del complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIIaR en las redes cristalinas se determinaron basándose en la función de rotación y la función de traslación. El valor del factor R de fiabilidad cristalográfica del modelo estructural para los datos de intensidad difractada de 25 a 3.0 Å era 38.4% y el valor R libre era 30.0% después del refinamiento del cuerpo rígido del modelo estructural inicial obtenido que mueve los dos dominios CH2 y dos dominios CH3 de la región Fc y la región extracelular de FcγRIIIaR. Después, el refinamiento del modelo estructural se logró repitiendo el refinamiento estructural usando el programa REFMAC5 (*Acta Cryst.* (2011) D67, 355-367) seguido de la revisión del modelo estructural realizado usando el programa Coot (*Acta Cryst.* (2010) D66, 486-501) con referencia a los mapas de densidad electrónica donde se calcularon los coeficientes Fo-Fc y 2Fo-Fc usando el factor estructural Fo experimentalmente determinado, el factor estructural Fc calculado según el modelo y las fases calculadas según el modelo. Finalmente, como resultado de la incorporación de moléculas de agua en el modelo basado en los mapas de densidad electrónica que usan 2Fo-Fc o Fo-Fc como coeficiente, y el siguiente refinamiento, el factor de fiabilidad cristalográfica, los valores R y el valor R libre del modelo que contenía 4758 átomos que no eran de hidrógeno se convirtió en 26.3% y 38.0% para 24838 datos de intensidad de difracción de 25 Å a 2.87 Å de resolución, respectivamente.

La estructura tridimensional del complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIIaR se determinó a una resolución de 2.87 Å por análisis estructural. Una comparación de la estructura cristalina entre el complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIIa tipo R y el complejo de Fc (P208)/región extracelular de FcγRIIIb descrita en el Ejemplo (14-1) no detectó casi ninguna diferencia a nivel de la estructura general (Fig. 36), reflejando la identidad de aminoácidos muy alta entre los dos receptores Fcγ.

Sin embargo, una observación precisa de las estructuras a nivel de densidad electrónica detectó algunas diferencias que pueden conducir a la mejora de la selectividad entre la unión a FcγRIIIb y la unión a FcγRIIIaR de la región Fc. El resto de aminoácido en la posición 160 en FcγRIIIaR no es Tyr sino Phe. Como se muestra en la Fig. 37, el enlace de hidrógeno entre la cadena principal del resto de aminoácido en la posición 237 (numeración EU) en el dominio CH2 de A de la región Fc y la Tyr en la posición 160 en FcγRIIIb, aunque se formó tras la unión entre FcγRIIIb y la región Fc con la alteración P238D, se espera que no se forme tras la unión entre FcγRIIIb y la región Fc con la alteración P238D. La ausencia de formación de enlace de hidrógeno puede ser un factor importante para mejorar la selectividad entre la unión a FcγRIIIb y la unión a FcγRIIIaR de la región Fc con la alteración P238D introducida. La comparación adicional a nivel de densidad electrónica mostró que, en el complejo de región Fc/FcγRIIIb, la densidad electrónica era claramente observable para las cadenas laterales de Leu en las posiciones 235 (numeración EU) y 234 (numeración EU), mientras que la densidad electrónica de las cadenas laterales no estaba clara en el complejo región Fc/FcγRIIIaR. Esto sugiere que el bucle cerca de la posición 237 (numeración EU) se vuelve flexible debido a la interacción reducida con FcγRIIIaR alrededor de esta posición. Por otro lado, una comparación estructural del dominio CH2 de B de la región Fc (Fig. 38) en la misma región puso de manifiesto que, en el complejo de la región Fc y FcγRIIIb, la densidad electrónica era observable hasta el Asp en la posición 237 (numeración EU), mientras que, en la estructura del complejo de la región Fc y FcγRIIIaR, la densidad electrónica era observable hasta tres restos antes del Asp en la posición 237 (numeración EU), es decir, hasta alrededor de la Leu en la posición 234 (numeración EU), lo que sugiere que la unión a FcγRIIIaR forma una interacción a lo largo de una región más grande en comparación con la unión de FcγRIIIb. El hallazgo descrito antes sugiere la posibilidad de que, en el dominio CH2 de A de la región Fc, la región desde la posición 234 a 238 (numeración EU) tenga una gran contribución a la unión entre la región Fc y FcγRIIIb, mientras que en el dominio CH2 de B de la región Fc, la región desde la posición 234 a la 238 (numeración EU) tiene una gran contribución a la unión entre la región Fc y FcγRIIIaR.

Ejemplo 15. Variantes de Fc para las que se determinaron los sitios de alteración basándose en la estructura cristalina

Como se describe en el Ejemplo 14, se sugirió que el Asp en la posición 268 (numeración EU) interactuaba electrostáticamente con la Arg en la posición 292 (numeración EU) (Fig. 34) como resultado del cambio estructural local debido a la introducción de la alteración P271G en el dominio B de la variante con unión a FcγRIIIb mejorada (P208). Existe la posibilidad de que la estructura del bucle en las posiciones 266 a 271 (numeración EU) se establezca por la formación de la interacción, dando como resultado una mejora de la unión a FcγRIIIb. Por lo tanto, los autores de la presente invención evaluaron si la unión a FcγRIIIb de la variante se podría mejorar mediante la estabilización adicional de su estructura de bucle debido a la mejora de la interacción electrostática sustituyendo el Asp por Glu en la posición 268 (numeración EU) en la variante. Por otro lado, como se muestra en la Fig. 33, la Tyr en la posición 160 (numeración EU) en FcγRIIIb interactúa con la cadena principal del Asp en la posición 237 (numeración EU) en el

dominio A de P208. Por otro lado, la cadena lateral del Asp en la posición 237 (numeración EU) se encuentra cerca de la Ile en la posición 332, Glu en la posición 333 y Lys en la posición 334 (numeración EU) en la molécula sin formar ninguna interacción particularmente significativa. Por lo tanto, los autores de la presente invención también evaluaron si la interacción con la Tyr en la posición 160 en FcγRIIb se puede mejorar mediante la estabilización de la estructura de bucle en las posiciones 266 a 271 (numeración EU) debido a una mayor interacción con la cadena lateral del Asp en la posición 237 (UE numeración) sustituyendo restos de aminoácidos hidrófilos en las posiciones descritas antes.

Las variantes de IL6R-BP230/IL6R-L preparadas como se describe en el ejemplo 13 se produjeron introduciendo cada una de las alteraciones H268E, I332T, I332S, I332E, I332K, E333K, E333R, E333S, E333T, K334S, K334T y K334E. Se usó IL6R-L (SEQ ID NO: 56) como la cadena L del anticuerpo. Los anticuerpos que contienen la cadena ligera de IL6R-L y las variantes de cadena pesada descritas antes se expresaron y purificaron de acuerdo con el método descrito en el ejemplo de referencia 1. Los anticuerpos purificados se evaluaron para determinar su unión a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIaH, FcγRIIaR, FcγRIIb o FcγRIIIaV) por el método descrito en el ejemplo de referencia 2.

La KD de cada variante para cada FcγR se muestra en la Tabla 21. En la tabla, "alteración" se refiere a una alteración introducida en IL6R-BP3 (SEQ ID NO: 63). IL6R-B3/IL6R-L, que se usa como molde para producir IL6R-BP230, se indica con un asterisco (*). KD (IIb) del polipéptido original/KD (IIb) del polipéptido alterado en la tabla muestra el valor obtenido dividiendo el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb. Por otro lado, KD (IIaR) del polipéptido original/KD (IIaR) del polipéptido alterado muestra el valor obtenido dividiendo el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para FcγRIIaR entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIaR. KD (IIaR)/KD (IIb) muestra el valor obtenido dividiendo la KD de cada variante para FcγRIIaR entre la KD de la variante para FcγRIIb. Cuanto mayor es el valor, mayor es la selectividad para FcγRIIb. En la Tabla 21, el número en las celdas sombreadas en gris indica que se concluyó que la unión de FcγR a IgG era demasiado débil para analizar correctamente por análisis cinético y, por lo tanto, se calculó usando:

Ecuación 2

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

descrito en el ejemplo de referencia 2.

Tabla 21

NOMBRE DE VARIANTE	ALTERACIÓN INTRODUCIDA EN IL6R-BP230	KD FRENTE A FcγRIa (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIaR (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIaH (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIb (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIIaV (mol/L)	KD (IIaR)/KD (IIb)	KD(IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/ KD(IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO	KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/ KD(IIb) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO
IL6R-G1d/IL6R-L		3.20E-10	1.00E-06	6.70E-07	2.60E-06	3.50E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-B3/IL6R-L	*	4.20E-10	1.10E-06	7.70E-07	3.10E-06	3.30E-07	0.3	1	1
IL6R-BP230/IL6R-L		1.40E-08	5.70E-07	9.60E-06	2.10E-08	6.70E-05	27.5	1.9	149
IL6R-BP264/IL6R-L	H268E	6.50E-09	4.80E-07	9.20E-06	1.20E-08	5.20E-05	40.6	2.3	265
IL6R-BP384/IL6R-L	K334R	3.00E-09	1.30E-06	1.80E-05	7.10E-08	4.10E-05	17.7	0.9	43.5
IL6R-BP390/IL6R-L	I332S	1.60E-09	4.90E-07	7.30E-06	2.10E-08	2.90E-05	22.9	2.2	144.9
IL6R-BP391/IL6R-L	I332T	9.60E-10	3.40E-07	4.40E-06	1.30E-08	1.90E-05	26.6	3.2	242.2
IL6R-BP392/IL6R-L	I332K	7.90E-09	7.30E-06	2.80E-05	9.90E-07	2.90E-05	7.3	0.2	3.1
IL6R-BP393/IL6R-L	I332R	1.10E-08	3.90E-06	4.60E-05	2.70E-06	4.80E-05	1.4	0.3	1.2
IL6R-BP465/IL6R-L	E333K	1.60E-08	6.10E-07	1.50E-05	2.10E-08	6.70E-05	29.8	1.8	151.2
IL6R-BP466/IL6R-L	E333R	1.50E-08	5.20E-07	1.10E-05	1.70E-08	2.90E-05	30.4	2.1	181.3
IL6R-BP467/IL6R-L	K334S	8.90E-10	1.10E-06	1.20E-05	4.10E-08	3.20E-05	25.8	1	75.4
IL6R-BP468/IL6R-L	K334T	9.70E-10	1.10E-06	9.70E-06	4.00E-08	2.70E-05	26.3	1	77.7
IL6R-BP469/IL6R-L	E333S	1.30E-08	6.00E-07	1.20E-05	2.30E-08	3.70E-05	26.4	1.8	136.6
IL6R-BP470/IL6R-L	E333T	1.50E-08	4.90E-07	1.00E-05	1.60E-08	3.70E-05	30.6	2.2	192.5

Tanto la actividad de unión a FcγRIIb como la selectividad de FcγRIIb de IL6R-BP264/IL6R-L, IL6R-BP465/IL6R-L, IL6R-BP466/IL6R-L e IL6R-BP470, que resultan de la introducción de alteraciones H268E, E333K, E333R y E333T, respectivamente, en IL6R-BP230/IL6R-L aumentaron en comparación con los de IL6R-BP230/IL6R-L. La selectividad de FcγRIIb de IL6R-BP391/IL6R-L con la alteración I332T introducida se redujo mientras que su actividad de unión a FcγRIIb aumentó en comparación con IL6R-BP230/IL6R-L.

Ejemplo 16. Introducción extensa de alteraciones en restos de aminoácidos alrededor de la posición 271 (numeración EU)

En la comparación estructural entre Fc (P208) y FcγRIIb y Fc (P238D)/FcγRIIb, la diferencia más significativa se encuentra en la estructura alrededor de la posición 271 (numeración EU) en el dominio CH2 de B de la región Fc (Fig. 33). Como se describe en el Ejemplo 11, se sugiere que, cuando, en Fc (P238D), el Asp en la posición 270 (numeración EU) forma una interacción electrostática estrecha con la Arg en la posición 131 en FcγRIIb, la interacción puede inducir estrés estereoquímico en la Pro en la posición 271 (numeración EU). En la estructura de Fc (P208)/FcγRIIb, debido a la sustitución de Pro por Gly en la posición 271 (numeración EU), se producía una desviación posicional a nivel de la cadena principal para eliminar la distorsión estructural, lo que da como resultado un gran cambio estructural alrededor de la posición 271. Existe la posibilidad de que la estabilización adicional de la estructura cambiada alrededor de la posición 271 reduzca más la pérdida de energía entrópica causada por la unión tras formación de una interacción

electrostática con Arg en la posición 131 en FcγRIIb. Por lo tanto, se buscaron alteraciones que mejorasen la unión a FcγRIIb o aumentaran la selectividad de FcγRIIb de la región Fc por introducción extensa de alteraciones en los restos de aminoácidos alrededor de la posición 271 (numeración EU).

IL6R-BP267 se construyó como un molde en la introducción extensa de alteraciones introduciendo las alteraciones E233D, G237D, P238D, H268E y P271G en IL6R-B3 (SEQ ID NO: 63). Se usó IL6R-L (SEQ ID NO: 56) como la cadena L del anticuerpo. Los anticuerpos que contienen la cadena ligera de IL6R-L y las variantes de cadena pesada descritas antes se expresaron y purificaron de acuerdo con el método descrito en el ejemplo de referencia 1. Los anticuerpos purificados se evaluaron para determinar su unión a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIaH, FcγRIIaR, FcγRIIb o FcγRIIIaV) por el método descrito en el ejemplo de referencia 2. Los aminoácidos en las posiciones 264, 265, 266, 267, 269 y 272 (numeración EU) en IL6R-BP267 se sustituyeron con cada uno de los 18 tipos de aminoácidos, excepto Cys y el aminoácido previo a la sustitución. Se usó IL6R-L (SEQ ID NO: 56) como la cadena L del anticuerpo. Los anticuerpos que contenían la cadena ligera de IL6R-L y las variantes de cadena pesada descritas antes se expresaron y purificaron de acuerdo con el método descrito en el ejemplo de referencia 1. Los anticuerpos purificados se evaluaron para determinar su unión a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIaH, FcγRIIaR, FcγRIIb o FcγRIIIaV) por el método descrito en el ejemplo de referencia 2. Las variantes cuya unión a FcγRIIb se ha mejorado o la selectividad de FcγRIIb se ha aumentado en comparación con la unión a FcγRIIb o la selectividad de FcγRIIb de IL6R-BP267/IL6R-L antes de la introducción de las alteraciones se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22

NOMBRE DE VARIANTE	ALTERACIÓN INTRODUCIDA EN IL6R-BP267	KD FRENTE A FcγRIa (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIaH (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIaR (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIb (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIIaV (mol/L)	KD (IIaR)/KD (IIb)	KD(IIaR) DEL POLIPEPTIDO ORIGINAL/ KD(IIaR) DEL POLIPEPTIDO ALTERADO	KD(IIb) DEL POLIPEPTIDO ORIGINAL/ KD(IIb) DEL POLIPEPTIDO ALTERADO
IL6R-B3/IL6R-L	*	3.20E-10	1.00E-06	6.70E-07	2.60E-06	3.50E-07	0.4	1	1
IL6R-BP267/IL6R-L		4.00E-09	1.70E-06	1.90E-05	1.30E-07	5.30E-05	13	0.6	20.5
IL6R-BP348/IL6R-L	S267A	5.50E-10	7.00E-07	2.20E-05	4.60E-08	2.70E-05	15.3	1.4	56.9
IL6R-BP300/IL6R-L	V264I	9.60E-09	6.90E-07	2.20E-05	5.80E-08	5.60E-05	11.9	1.4	44.8
IL6R-BP367/IL6R-L	E269D	3.10E-09	1.20E-06	4.60E-05	1.00E-07	5.30E-05	11.7	0.8	25.7
IL6R-BP350/IL6R-L	S267E	8.90E-10	1.50E-07	8.30E-05	1.00E-07	8.90E-05	1.5	6.5	25.2
IL6R-BP333/IL6R-L	V266F	9.10E-09	1.50E-06	3.40E-05	1.20E-07	5.90E-05	12.5	0.7	22.2
IL6R-BP352/IL6R-L	S267G	1.80E-09	1.90E-06	2.80E-05	1.20E-07	4.30E-05	15.7	0.5	21.3
IL6R-BP339/IL6R-L	V266M	4.60E-09	1.40E-06	1.80E-05	1.30E-07	2.40E-05	11.3	0.7	20.6
IL6R-BP520/IL6R-L	E272M	3.90E-09	3.00E-06	3.10E-05	1.70E-07	4.70E-05	17.5	0.3	14.9
IL6R-BP523/IL6R-L	E272Q	3.70E-09	2.70E-06	3.90E-05	1.70E-07	4.10E-05	15.9	0.4	15.5
IL6R-BP313/IL6R-L	D265E	2.60E-08	1.30E-05	4.70E-05	8.40E-07	3.80E-05	15.6	0.1	3.1
IL6R-BP513/IL6R-L	E272D	3.80E-09	1.70E-06	3.90E-05	1.10E-07	7.50E-05	15.4	0.6	23.6
IL6R-BP521/IL6R-L	E272N	3.60E-09	2.90E-06	4.40E-05	1.90E-07	9.90E-05	15.2	0.3	13.5
IL6R-BP338/IL6R-L	V266L	1.50E-08	2.20E-06	2.20E-05	1.50E-07	2.50E-05	15	0.5	17.9
IL6R-BP517/IL6R-L	E272I	3.20E-09	2.10E-06	2.20E-05	1.40E-07	3.50E-05	14.7	0.5	18.1
IL6R-BP514/IL6R-L	E272F	4.30E-09	3.00E-06	6.40E-05	2.10E-07	9.10E-05	14	0.3	12.3

El valor de KD de cada variante para cada FcγR se muestra en la Tabla 22. En la tabla, "alteración" se refiere a una alteración introducida en IL6R-B3, que se usó como molde. IL6R-B3/IL6R-L, que se usa como molde para producir IL6R-BP267, se indica con un asterisco (*). En la tabla, KD (IIb) del polipéptido original/KD (IIb) del polipéptido alterado muestra el valor obtenido dividiendo el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb. Por otro lado, KD (IIaR) del polipéptido original/KD (IIaR) del polipéptido alterado muestra el valor obtenido dividiendo la KD de IL6R-B3/IL6R-L para FcγRIIaR entre la KD de cada variante para FcγRIIaR. KD (IIaR)/KD (IIb) muestra el valor obtenido dividiendo el valor de KD de cada variante para FcγRIIaR entre el valor de KD de la variante para FcγRIIb. Cuanto mayor es el valor, mayor es la selectividad para FcγRIIb. En la Tabla 22, el número en las celdas sombreadas en gris indica que se concluyó que la unión de FcγR a IgG era demasiado débil para analizar correctamente por análisis cinético y, por lo tanto, se calculó usando:

Ecuación 2

$$KD = C \cdot R_{\text{máx}} / (R_{\text{eq}} - R) - C$$

descrita en el ejemplo de referencia 2.

Todas las actividades de unión de las variantes mostradas en la Tabla 22 a FcγRIa, FcγRIIaH y FcγRIIIaV eran comparables o menores en comparación con las de IL6R-B3/IL6R-L. Por otro lado, la actividad de unión a FcγRIIb de las variantes que resultan de añadir las alteraciones S267A, V264I, E269D, S267E, V266F, S267G y V266M, respectivamente, a IL6R-BP267/IL6R-L aumentó en comparación con la de IL6R-BP267/IL6R-L antes de la adición de la alteración. Por otro lado, los valores de KD (IIaR)/KD (IIb) de las variantes que resultan de añadir las alteraciones S267A, S267G, E272M, E272Q, D265E, E272D, E272N, V266L, E272I y E272F, respectivamente, a IL6R-BP267/IL6R-L aumentó en comparación con el de IL6R-BP267/IL6R-L antes de añadir la alteración. Esto demuestra que las alteraciones S267A, S267G, E272M, E272Q, D265E, E272D, E272N, V266L, E272I y E272F producen el efecto de mejorar la selectividad de FcγRIIb.

Ejemplo 17. Mejora de la unión a FcγRIIb por introducción de alteraciones en la región CH3

Se ha descrito que una alteración de sustitución de Pro por Leu en la posición 396 (numeración EU) mejora la unión a FcγRIIb (*Cancer Res.* (2007) 67, 8882-8890). El aminoácido en la posición 396 (numeración EU) está presente en una posición que no está directamente implicada en la interacción con FcγR. Sin embargo, se puede suponer que el aminoácido tiene un efecto en la interacción con FcγR al cambiar la estructura del anticuerpo. Por lo tanto, los autores de la presente invención evaluaron si la unión a FcγRIIb de la región Fc aumenta o si su selectividad por FcγRIIb aumenta por introducción extensa de alteraciones de aminoácidos en la posición 396 (numeración EU) en la región Fc.

IL6R-BP423 se construyó como un molde en la introducción extensa de alteraciones mediante la introducción de las alteraciones E233D, G237D, P238D, S267A, H268E, P271G y A330R en IL6R-B3 (SEQ ID NO: 63). Se construyeron variantes, en las cuales el aminoácido en la posición 396 (numeración EU) en IL6R-BP423 se sustituyó por cada uno de los 18 tipos de aminoácidos, excepto la cisteína y el aminoácido antes de la sustitución. Se usó IL6R-L (SEQ ID NO: 56) como la cadena L del anticuerpo. Los anticuerpos que contienen la cadena ligera de IL6R-L y las variantes de cadena pesada descritas antes se expresaron y purificaron de acuerdo con el método descrito en el ejemplo de referencia 1. Los anticuerpos purificados se evaluaron para determinar su unión a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIaH, FcγRIIaR, FcγRIIb o FcγRIIIaV) por el método descrito en el ejemplo de referencia 2. La unión de las variantes resultantes a cada FcγR se muestra en la Tabla 23.

Tabla 23

NOMBRE DE VARIANTE	ALTERACIÓN INTRODUCIDA EN IL6R-BP423	KD FRENTE A FcγRIa (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIaR (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIaH (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIb (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIaV (mol/L)	KD (IIaR) / KD (IIb)	KD(IIaR) DEL POLIPEPTIDO ORIGINAL / KD(IIaR) DEL POLIPEPTIDO ALTERADO	KD (IIb) DEL POLIPEPTIDO ORIGINAL / KD (IIb) DEL POLIPEPTIDO ALTERADO
IL6R-G1d/IL6R-L		3.20E-10	1.00E-06	6.70E-07	2.60E-06	3.50E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-B3/IL6R-L	*	4.20E-10	1.10E-06	7.70E-07	3.10E-06	3.30E-07	0.3	1	1
IL6R-BP423/IL6R-L		7.70E-10	1.80E-07	2.00E-06	5.10E-09	1.60E-05	34.2	6.3	604
IL6R-BP447/IL6R-L	P396A	9.00E-10	1.60E-07	2.00E-06	5.30E-09	2.50E-05	29.7	7	584
IL6R-BP448/IL6R-L	P396D	7.50E-10	1.30E-07	1.40E-06	4.10E-09	9.70E-06	31.7	8.5	759
IL6R-BP449/IL6R-L	P396E	9.10E-10	1.40E-07	1.50E-06	4.60E-09	1.20E-05	29.8	8	667
IL6R-BP450/IL6R-L	P396F	8.40E-10	1.20E-07	1.30E-06	4.10E-09	9.60E-06	29.4	9.2	763
IL6R-BP451/IL6R-L	P396G	9.80E-10	1.80E-07	2.00E-06	6.20E-09	1.20E-05	29.2	6.1	499
IL6R-BP452/IL6R-L	P396H	7.50E-10	1.30E-07	1.50E-06	5.10E-09	1.10E-05	25.9	8.3	602
IL6R-BP453/IL6R-L	P396I	7.50E-10	1.20E-07	9.30E-07	4.60E-09	7.40E-06	25.5	9.4	675
IL6R-BP454/IL6R-L	P396K	8.20E-09	1.30E-07	1.40E-06	4.80E-09	9.10E-06	27.5	8.4	649
IL6R-BP455/IL6R-L	P396L	7.50E-10	1.30E-07	1.60E-06	4.00E-09	8.30E-06	31.8	8.6	767
IL6R-BP456/IL6R-L	P396M	6.00E-10	1.20E-07	2.00E-06	3.50E-09	9.20E-06	35.3	8.9	888
IL6R-BP457/IL6R-L	P396N	9.10E-10	1.50E-07	2.60E-06	5.20E-09	1.30E-05	28.9	7.3	591
IL6R-BP458/IL6R-L	P396Q	7.80E-10	1.40E-07	1.40E-06	4.50E-09	1.10E-05	31.1	7.9	687
IL6R-BP459/IL6R-L	P396R	1.10E-09	1.50E-07	1.40E-06	5.10E-09	1.20E-05	28.9	7.5	607
IL6R-BP460/IL6R-L	P396S	8.70E-10	1.60E-07	3.20E-06	6.50E-09	1.40E-05	25.2	6.7	478
IL6R-BP461/IL6R-L	P396T	1.30E-09	1.30E-07	1.50E-06	5.10E-09	9.90E-06	24.4	8.8	602
IL6R-BP462/IL6R-L	P396V	9.70E-10	1.30E-07	1.40E-06	5.20E-09	9.00E-06	25	8.5	593
IL6R-BP463/IL6R-L	P396W	1.30E-09	1.60E-07	1.90E-06	5.60E-09	1.20E-05	28.1	7	554
IL6R-BP464/IL6R-L	P396Y	1.10E-09	1.30E-07	2.10E-06	4.00E-09	9.90E-06	31.5	8.7	773

En la tabla, "alteración introducida en IL6R-BP423" se refiere a una alteración introducida en IL6R-BP423, que se usó como molde. IL6R-B3/IL6R-L, que se usa como el molde para producir IL6R-BP423, se indica con un asterisco (*). En la tabla, KD (IIb) del polipéptido original/KD (IIb) del polipéptido alterado muestra el valor obtenido dividiendo el valor

de KD de IL6R-B3/IL6R-L para FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb. Por otro lado, KD (IIaR) del polipéptido original/KD (IIaR) del polipéptido alterado muestra el valor obtenido dividiendo el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para FcγR IIaR entre el valor de KD de cada variante para FcγR IIaR. KD (IIaR)/KD (IIb) muestra el valor obtenido dividiendo la KD de cada variante para FcγRIIaR entre la KD de la variante para FcγRIIb. Cuanto mayor es el valor, mayor es la selectividad para FcγRIIb. En la Tabla 23, el número en las celdas sombreadas en gris indica que se concluyó que la unión de FcγR a IgG era demasiado débil para analizar correctamente por análisis cinético y, por lo tanto, se calculó usando:

Ecuación 2

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

descrita en el ejemplo de referencia 2.

El resultado que se muestra en la Tabla 23 demuestra que: la actividad de unión a FcγRIIb de IL6R-BP456/IL6R-L que resulta de introducir la alteración P396M en IL6R-BP423/IL6R-L, IL6R-BP455/IL6R-L que resulta de introducir la alteración P396L en IL6R-BP423/IL6R-L, IL6R-BP464/IL6R-L que resulta de introducir la alteración P396Y en IL6R-BP423/IL6R-L, IL6R-BP450/IL6R-L que resulta de introducir la alteración P396F en IL6R-BP423/IL6R-L, IL6R-BP448/IL6R-L que resulta de introducir la alteración P396D en IL6R-BP423/IL6R-L, IL6R-BP458/IL6R-L que resulta de introducir la alteración P396Q en IL6R-BP423/IL6R-L, IL6R-BP453/IL6R-L que resulta de introducir la alteración P396I en IL6R-BP423/IL6R-L, IL6R-BP449/IL6R-L que resulta de introducir la alteración P396E en IL6R-BP423/IL6R-L, IL6R-BP454/IL6R-L que resulta de introducir la alteración P396K en IL6R-BP423/IL6R-L, y IL6R-BP459/IL6R-L que resulta de introducir la alteración P396R en IL6R-BP423/IL6R-L aumentaron todas en comparación con la de IL6R-BP423/IL6R-L antes de introducir las alteraciones. Por otro lado, el valor de KD (IIaR)/KD (IIb) de IL6R-BP456/IL6R-L que resulta de introducir la alteración P396M en IL6R-BP423/IL6R-L era mayor en comparación con el de IL6R-BP423/IL6R-L antes de introducir la alteración, demostrando la selectividad mejorada de FcγRIIb. Como se ve en la Tabla 23, la actividad de unión de las variantes preparadas para FcγRIa, FcγRIIaH y FcγRIIIaV era menor que la de IL6R-B3/IL6R-L, que era el polipéptido original.

Ejemplo 18. Preparación de variantes con unión a FcγRIIb mejorada usando secuencias de subclases

El perfil de unión a FcγR varía dependiendo de la subclase de IgG humana. Los autores de la presente invención evaluaron si la diferencia en la actividad de unión a cada FcγR entre la IgG1 y la IgG4 se podría usar para aumentar la actividad de unión a FcγRIIb y/o mejorar la selectividad. Primero, se analizaron la IgG1 y la IgG4 para determinar su actividad de unión a cada FcγR. Se construyó IL6R-G4d (SEQ ID NO: 64) que contiene G4d como la cadena H del anticuerpo. G4d es una región Fc que carece de Gly y Lys C-terminal y contiene una sustitución de Ser por Pro en la posición 228 (numeración EU) en la IgG4 humana. Se usó IL6R-L (SEQ ID NO: 56) como la cadena L del anticuerpo. Los anticuerpos que contienen la cadena ligera de IL6R-L e IL6R-G1d/IL6R-L o IL6R-G4d/IL6R-L se expresaron y purificaron de acuerdo con el método descrito en el ejemplo de referencia 1. Los anticuerpos purificados se evaluaron para determinar su unión a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIaH, FcγRIIaR, FcγRIIb o FcγRIIIaV) por el método descrito en el ejemplo de referencia 2. La unión de las variantes resultantes a cada FcγR se resume en la Tabla 24.

Tabla 24

Nombre de variante	KD frente a FcγRIa (mol/l)	KD frente a FcγRIIaR (mol/l)	KD frente a FcγRIIaH (mol/l)	KD frente a FcγRIIb (mol/l)	KD frente a FcγRIIIaV (mol/l)
IL6R-G1d/IL6R-L	1.20E-10	9.70E-07	6.50E-07	3.90E-06	4.20E-07
IL6R-G4d/IL6R-L	6.60E-10	2.10E-06	3.40E-06	2.60E-06	3.40E-06

Se demostró que la unión FcγRIIb de IL6R-G4d/IL6R-L era 1.5 veces más fuerte que la de IL6R-G1d/IL6R-L, mientras que la unión a FcγRIIaR de IL6R-G4d/IL6R-L era 2.2 veces más débil que la de IL6R-G1d/IL6R-L. Por otro lado, la actividad de unión de IL6R-G4d/IL6R-L a FcγRIa, FcγRIIaH y FcγRIIIaV era menor que la de IL6R-G1d/IL6R-L. El resultado descrito antes puso de manifiesto que IL6R-G4d tenía características preferibles en comparación con IL6R-G1d en términos de actividad de unión a FcγRIIb y selectividad.

La figura 39 es un alineamiento para comparar las secuencias CH1 de G1d y G4d hasta el extremo C (posiciones 118 a 445 (numeración EU)). En la Fig. 39, los restos de aminoácidos que son diferentes entre G1d y G4d están rellenos de negro. Los autores de la presente invención evaluaron si la unión a FcγRIIb se podría aumentar más y/o la selectividad de FcγRIIb se podría mejorar todavía más seleccionando, de los diferentes aminoácidos descritos antes, algunas porciones que se predice que están implicadas en la interacción con FcγR, e injertando al menos un resto de aminoácido o más de la secuencia de G4d, que confiere una propiedad preferible desde el punto de vista tanto de la actividad de unión a FcγRIIb como de la selectividad, a una variante con unión a FcγRIIb mejorada.

Específicamente, los autores de la presente invención produjeron:

IL6R-BP473 que resulta de introducir la alteración A327G en IL6R-BP230;

IL6R-BP472 que resulta de introducir la alteración A330S en IL6R-BP230;

IL6R-BP471 que resulta de introducir la alteración P331S en IL6R-BP230;

IL6R-BP474 que resulta de introducir las alteraciones A330S y P331S en IL6R-BP230;

5 IL6R-BP475 que resulta de introducir las alteraciones A327G y A330S en IL6R-BP230;

IL6R-BP476 que resulta de introducir las alteraciones A327G, A330S y P331S en IL6R-BP230; y

10 IL6R-BP477 que resulta de introducir las alteraciones A327G y P331S en IL6R-BP230. Además, para construir IL6R-BP478, los aminoácidos desde Ala en la posición 118 a Thr en la posición 225 (numeración EU) en IL6R-BP230 se sustituyeron por los aminoácidos de la secuencia G4d desde Ala en la posición 118 a Pro en la posición 222 (Numeración de la UE). Se usó IL6R-L (SEQ ID NO: 56) como la cadena L del anticuerpo. Los anticuerpos que contienen la cadena ligera de IL6R-L y las variantes de cadena pesada descritas antes se purificaron de acuerdo con el método descrito en el ejemplo de referencia 1. Los anticuerpos purificados se evaluaron para determinar su actividad de unión a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIaH, FcγRIIaR, FcγRIIb o FcγRIIIaV) por el método descrito en el ejemplo de referencia 2.

15 El valor de KD de cada variante para cada FcγR se muestra en la Tabla 25. "KD (IIb) del polipéptido original/KD (IIb) del polipéptido alterado" en la tabla muestra el valor obtenido dividiendo el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb. En la tabla, "alteración introducida en IL6R-BP230" se refiere a una alteración introducida en IL6R-BP230. IL6R-B3/IL6R-L, que se usa como el molde para producir IL6R-BP230, se indica por *1. Por otro lado, IL6R-BP478, en el que la secuencia G4d desde Ala en la posición 118 hasta Pro en la posición 222 (numeración EU) se ha sustituido por el segmento desde Ala en la posición 118 hasta Thr en la posición 225 (numeración EU) en IL6R-BP230, se indica con *2. "KD (IIaR) del polipéptido original/KD (IIaR) del polipéptido alterado" muestra el valor obtenido dividiendo el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para FcγR IIaR entre el valor de KD de cada variante para FcγR IIaR. KD (IIaR)/KD (IIb) muestra el valor obtenido dividiendo la KD de cada variante para FcγRIIaR entre la KD de la variante para FcγRIIb. Cuanto mayor es el valor, mayor es la selectividad para FcγRIIb. En la Tabla 25, el número en las celdas sombreadas en gris indica que se concluyó que la unión de FcγR a IgG era demasiado débil para analizar correctamente por análisis cinético y, por lo tanto, se calculó usando:

Ecuación 2

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

descrita en el ejemplo de referencia 2.

30 Tabla 25

NOMBRE DE VARIANTE	ALTERACIÓN INTRODUCIDA EN IL6R-BP230	KD FcγRIa (mol/L)	KD FcγRIIaR (mol/L)	KD FcγRIIa1 (mol/L)	KD FcγRIIb (mol/L)	KD FcγRIIIaV (mol/L)	KD (IIaR)/KD (IIb)	KD(IIaR) DEL POLIPEPTIDO ORIGINAL / KD(IIaR) DEL POLIPEPTIDO ALTERADO	KD (IIb) DEL POLIPEPTIDO ORIGINAL / KD (IIb) DEL POLIPEPTIDO ALTERADO
IL6R-G1d/IL6R-L		3.20E-10	1.00E-06	6.70E-07	2.60E-06	3.50E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-B3/IL6R-L	*1	4.20E-10	1.10E-06	7.70E-07	3.10E-06	3.30E-07	0.3	1	1
IL6R-BP230/IL6R-L		1.40E-08	5.70E-07	9.60E-06	2.10E-08	6.70E-05	27.5	1.9	149
IL6R-BP471/IL6R-L	P331S	7.30E-09	8.00E-07	1.20E-05	3.50E-08	7.10E-05	22.7	1.4	88.1
IL6R-BP472/IL6R-L	A330S	5.20E-09	3.30E-06	2.40E-05	1.50E-07	3.80E-05	21.5	0.3	20.3
IL6R-BP473/IL6R-L	A327G	6.20E-09	3.80E-07	4.80E-06	1.80E-08	3.60E-05	21.1	2.9	172.2
IL6R-BP474/IL6R-L	A330S/P331S	4.10E-09	3.00E-06	3.70E-05	1.80E-07	5.50E-05	16.6	0.4	16.9
IL6R-BP475/IL6R-L	A327G/A330S	4.90E-09	1.00E-06	1.50E-05	1.10E-07	4.60E-05	9.7	1.1	29.2
IL6R-BP476/IL6R-L	A327G/A330S/P331S	5.90E-09	1.30E-06	1.90E-05	1.30E-07	4.90E-05	9.7	0.9	23.7
IL6R-BP477/IL6R-L	A327G/P331S	9.20E-09	5.10E-07	7.60E-06	3.70E-08	5.80E-05	14	2.2	84.9
IL6R-BP478/IL6R-L	*2	7.70E-09	5.40E-07	6.70E-06	1.90E-08	3.50E-05	28	2	160.6

De las variantes que se muestran en la Tabla 25, IL6R-BP473/IL6R-L con la alteración A327G introducida mostró que la unión a FcγRIIb aumentaba en 1.2 veces en comparación con Ila de L6R-BP230/IL6R-L. IL6R-BP478/IL6R-L

producido por la sustitución de los aminoácidos desde Ala en la posición 118 a Thr en la posición 225 (numeración EU) de IL6R-BP230 con los aminoácidos desde Ala en la posición 118 a Pro en la posición 222 (numeración EU) de la secuencia G4d tiene una unión 1.1 veces mayor a FcγRIIb que la de IL6R-BP230/IL6R-L, y la unión de IL6R-BP478/IL6R-L a FcγRIIaR disminuye a 0.9 veces la de IL6R-BP230/IL6R-L. Las actividades de unión de todas las variantes a FcγRIa, FcγRIIaH y FcγRIIIaV eran más bajas que las del polipéptido original IL6R-B3/IL6R-L.

En el examen llevado a cabo hasta el momento, se mostró que la introducción de la alteración A327G, que sustituye el aminoácido en la posición 327 (numeración EU) por el aminoácido en la secuencia de IgG4 humana en la variante IL6R-BP230/IL6R-L, mejora la actividad de unión a FcγRIIb. Se realizó un examen adicional para los aminoácidos que no coinciden entre las secuencias de IgG4 e IgG1 y las distintas al aminoácido en la posición 327 (numeración EU). Específicamente, se produjeron variantes introduciendo las siguientes alteraciones en IL6R-BP230, que se usó como la cadena H del anticuerpo: se introdujo K274Q para producir IL6R-BP541; se introdujo Y296F para producir IL6R-BP542; se introdujo H268Q para producir IL6R-BP543; se introdujo R355Q para producir IL6R-BP544; se introdujo D356E para producir IL6R-BP545; se introdujo L358M para producir IL6R-BP546; se introdujo K409R para producir IL6R-BP547; y se introdujo Q419E para producir IL6R-BP548, como lo indica la numeración EU, respectivamente. Por otro lado, se usó IL6R-L como la cadena L de anticuerpo común. Los anticuerpos que contienen la variante de cadena pesada anterior y la cadena ligera IL6R-L se purificaron de acuerdo con los métodos descritos en el ejemplo de referencia 1. Los anticuerpos purificados se evaluaron para determinar su unión a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIaH, FcγRIIaR, FcγRIIb o FcγRIIIaV) por el método del ejemplo de referencia 2.

La KD de cada variante para cada FcγR se muestra en la Tabla 26. En la tabla, "KD (IIb) del polipéptido original/KD (IIb) del polipéptido alterado" representa el valor obtenido dividiendo el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb. En la tabla, "alteración de IL6R-BP230" se refiere a una alteración introducida en IL6R-BP230. IL6R-B3/IL6R-L usado como molde para producir IL6R-BP230 se indica con * 1. En la tabla, "KD (IIb) del polipéptido original/KD (IIb) del polipéptido alterado" representa el valor obtenido dividiendo el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L a FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb. "KD (IIaR) del polipéptido original/KD (IIaR) del polipéptido alterado" representa el valor obtenido dividiendo el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para FcγRIIaR entre el valor de KD de la misma variante para FcγRIIaR. KD (IIaR)/KD (IIb) representa el valor obtenido dividiendo KD de cada variante para FcγRIIaR entre la KD de la misma variante para FcγRIIb. Cuanto mayor es el valor, mayor es la selectividad de FcγRIIb. En la Tabla 26, el número en la celda sombreada de gris indica que la unión de FcγR a IgG era débil, y se determinó que el análisis no podía realizarse correctamente mediante análisis cinético, y por lo tanto se calculó usando:

Ecuación 2

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

descrita en el ejemplo de referencia 2.

Tabla 26

NOMBRE DE VARIANTE	ALTERACIÓN INTRODUCIDA EN IL6R-BP230	KD FRENTE A FcγRIa (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIaR (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIaH (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIb (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIIaV (mol/L)	KD (IIaR)/KD (IIb)	KD (IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/ KD (IIaR) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO	KD (IIb) DEL POLIPÉPTIDO ORIGINAL/ KD (IIb) DEL POLIPÉPTIDO ALTERADO
IL6R-G1d/IL6R-L		3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	1.1	1.2
IL6R-B3/IL6R-L	*1	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	1.0	1.0
IL6R-BP230/IL6R-L		1.0E-08	4.9E-07	9.7E-06	1.8E-08	3.9E-05	28.0	2.2	175.6
IL6R-BP541/IL6R-L	K274Q	1.1E-08	4.5E-07	9.3E-06	1.6E-08	4.1E-05	27.8	2.4	189.6
IL6R-BP542/IL6R-L	Y296F	1.3E-08	4.9E-07	9.7E-06	2.0E-08	4.3E-05	24.4	2.2	153.7
IL6R-BP543/IL6R-L	H268Q	2.3E-08	5.6E-07	7.4E-06	2.0E-08	4.6E-05	27.3	1.9	151.5
IL6R-BP544/IL6R-L	R355Q	9.8E-09	4.8E-07	1.2E-05	1.7E-08	4.5E-05	28.8	2.2	183.9
IL6R-BP545/IL6R-L	D356E	9.9E-09	5.7E-07	9.1E-06	1.7E-08	4.5E-05	32.7	1.9	178.6
IL6R-BP546/IL6R-L	L358M	9.0E-09	5.0E-07	1.0E-05	1.5E-08	3.7E-05	32.8	2.2	204.6
IL6R-BP547/IL6R-L	K409R	1.2E-08	4.9E-07	7.5E-06	1.9E-08	3.5E-05	25.5	2.2	162.6
IL6R-BP548/IL6R-L	Q419E	1.2E-08	5.0E-07	9.4E-06	1.9E-08	3.4E-05	26.2	2.2	161.8

Como se muestra en la Tabla 26, IL6R-BP541/IL6R-L que resulta de introducir K274Q (cada uno representado por la numeración EU) en IL6R-BP230/IL6R-L, IL6R-BP544/IL6R-L que resulta de introducir R355Q en IL6R-BP230/IL6R-L, IL6R-BP545/IL6R-L que resulta de introducir D356E en IL6R-BP230/IL6R-L, e IL6R-BP546/IL6R-L que resulta de introducir L358M en IL6R-BP230/IL6R-L, mostraban mayor unión a FcγRIIb en comparación con IL6R-BP230/IL6R-L antes de introducir la alteración. De ellos, IL6R-BP544/IL6R-L que resulta de introducir R355Q (cada uno representado por la numeración EU) en IL6R-BP230/IL6R-L, IL6R-BP545/IL6R-L que resulta de introducir D356E en IL6R-BP230/IL6R-L, y IL6R-BP546/IL6R-L que resulta de introducir L358M en IL6R-BP230/IL6R-L, se mostró que tenían un mayor valor de KD (IIaR)/KD (IIb) y una selectividad mejorada para FcγRIIb, en comparación con IL6R-BP230/IL6R-L antes de introducir la alteración.

Ejemplo 19. Evaluación de combinaciones de alteraciones que mejoran la unión a FcγRIIb o mejoran la selectividad de FcγRIIb

Se evaluaron combinaciones adicionales de las alteraciones que se habían encontrado mediante la evaluación descrita antes para mejorar la unión a FcγRIIb o la selectividad de FcγRIIb. Específicamente, las alteraciones que se habían evaluado como eficaces para mejorar la unión a FcγRIIb y/o mejorar la selectividad de FcγRIIb se introdujeron en combinación en IL6R-B3 (SEQ ID NO: 63). Además, las alteraciones existentes S267E y L328F que mejoran la unión a FcγRIIb (Seung et al., (*Mol. Immunol* (2008) 45, 3926-3933)) se introdujeron en IL6R-B3 para producir IL6R-BP253 como un control de comparación. Se usó IL6R-L (SEQ ID NO: 56) como la cadena L del anticuerpo. Los anticuerpos que contienen la cadena ligera de IL6R-L y las variantes de cadena pesada descritas antes se expresaron y purificaron según el método descrito en el ejemplo de referencia 1. Los anticuerpos purificados se evaluaron para determinar su unión a cada FcγR (FcγRIa, FcγRIIaH, FcγRIIaR, FcγRIIb o FcγRIIIaV) por el método descrito en el ejemplo de referencia 2.

La KD de cada variante para cada FcγR se muestra en la Tabla 27. En la tabla, "alteración" se refiere a una alteración introducida en IL6R-B3 (SEQ ID NO: 63). IL6R-B3/IL6R-L, que se usa como molde para producir cada variante, se indica con un asterisco (*). KD (IIb) del polipéptido original/KD (IIb) del polipéptido alterado muestra el valor obtenido dividiendo el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para FcγRIIb entre el valor de KD de cada variante para FcγRIIb. Por otro lado, KD (IIaR) del polipéptido original/KD (IIaR) del polipéptido alterado muestra el valor obtenido dividiendo el valor de KD de IL6R-B3/IL6R-L para FcγRIIaR entre la KD de la variante para FcγRIIaR. KD (IIaR)/KD (IIb) muestra el valor obtenido dividiendo la KD de cada variante para FcγRIIaR entre la KD de la variante para FcγRIIb. Cuanto mayor es el valor, mayor es la selectividad para FcγRIIb en comparación con FcγRIIaR. Por otro lado, KD (IIaH)/KD (IIb) muestra el valor obtenido dividiendo la KD de cada variante para FcγRIIaH entre la KD de la variante para FcγRIIb. Cuanto mayor es el valor, mayor es la selectividad para FcγRIIb en comparación con FcγRIIaH. En la Tabla 27, el número en las celdas sombreadas de gris indica que se concluyó que la unión de FcγR a IgG era demasiado débil para analizar correctamente mediante análisis cinético y, por lo tanto, se calculó usando:

Ecuación 2

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

descrita en el ejemplo de referencia 2.

Tabla 27

NOMBRE DE VARIANTE	ALTERACIÓN	KD FRENTE A FcgRIa (mol/L)	KD FRENTE A FcgRIIaR (mol/L)	KD FRENTE A FcgRIaH (mol/L)	KD FRENTE A FcgRIIb (mol/L)	KD FRENTE A FcgRIIaV (mol/L)	KD(IaH)/ KD(IIb)	KD (IlaR) DEL POLIPEPTIDO ORIGINAL/ KD (IlaR) DEL POLIPEPTIDO ALTERADO	KD (Iib) DEL POLIPEPTIDO ORIGINAL/ KD (Iib) DEL POLIPEPTIDO ALTERADO
G1d		3.2E-10	1.0E-06	6.7E-07	2.6E-06	3.5E-07	0.4	0.3	1.2
B3	*	4.2E-10	1.1E-06	7.7E-07	3.1E-06	3.3E-07	0.3	0.2	1.0
BP253	S267E/L328F	6.7E-11	2.1E-09	1.2E-06	1.1E-08	3.6E-06	0.2	1.07.1	523.8
BP262	G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D/A330R	1.0E-08	2.0E-06	4.5E-06	1.2E-07	5.6E-06	17.0	375.0	0.5
BP264	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D/A330R	7.4E-08	3.5E-07	2.8E-06	1.2E-08	2.6E-06	28.3	227.6	3.2
BP265	G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D/A330R	2.3E-08	8.3E-07	1.2E-06	1.5E-08	9.6E-06	41.2	789.5	1.8
BP266	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/A330R	1.4E-08	3.2E-07	1.1E-05	1.8E-08	4.0E-06	18.0	621.5	3.4
BP268	E233D/G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D	4.5E-08	1.8E-06	2.1E-05	8.2E-08	2.8E-06	19.6	228.3	0.6
BP269	G237D/P238D/H268E/P271G/Y296D	1.4E-08	2.2E-06	7.2E-06	1.1E-07	1.4E-04	19.6	637.2	0.5
BP423	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R	7.7E-10	1.8E-07	2.0E-06	5.1E-09	1.6E-06	34.2	390.6	6.3
BP425	E233D/G237D/P238D/V266L/S267A/H268E/P271G/A330R	4.1E-08	2.2E-07	1.5E-05	9.1E-09	4.2E-06	23.6	1644.7	5.1
BP426	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269D/P271G/A330R	1.0E-08	1.6E-07	4.9E-06	5.9E-09	4.1E-06	27.8	8361.8	6.8
BP428	E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/A330R	4.8E-08	3.9E-07	4.2E-06	1.4E-08	3.6E-06	28.0	3000.0	2.8
BP429	E233D/G237D/P238D/V264I/S267G/H268E/P271G/A330R	6.2E-08	1.7E-07	3.5E-06	5.4E-09	6.8E-06	31.5	648.1	6.5
BP430	E233D/G237D/P238D/V266L/S267G/H268E/P271G/A330R	1.7E-08	2.2E-07	1.1E-06	1.2E-08	3.5E-06	18.5	908.1	4.8
BP431	E233D/G237D/P238D/S267G/H268E/E269D/P271G/A330R	3.6E-08	4.1E-07	7.8E-06	1.2E-08	3.2E-06	34.6	648.6	2.7
BP433	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/1832T	7.5E-10	6.8E-07	7.3E-06	3.4E-08	2.6E-06	20.0	216.0	1.6
BP434	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/1832T	5.5E-10	3.4E-07	4.1E-06	1.2E-08	2.5E-06	27.2	333.3	3.3
BP435	E233D/G237D/P238D/H268D/P271G/Y296D/A330R/1832T	1.0E-08	4.2E-07	3.4E-06	1.6E-08	2.2E-06	27.1	217.8	2.6
BP436	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/1832T	2.6E-10	2.2E-07	2.1E-06	5.1E-09	1.3E-06	43.8	411.0	4.9
BP437	G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/1832T	7.5E-10	2.2E-07	1.4E-06	5.9E-08	1.1E-06	37.7	236.5	4.9
BP438	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/A330R/1832T	2.1E-10	1.8E-07	1.6E-06	5.5E-09	6.8E-06	32.7	233.6	6.2
BP439	E233D/G237D/P238D/V264I/V266L/S267A/H268E/P271G/A330R	8.7E-08	1.3E-07	2.8E-06	6.1E-09	6.6E-06	20.9	460.5	8.7
BP440	E233D/G237D/P238D/V264I/H268E/P271G/A330R	8.7E-08	1.3E-07	1.6E-06	5.2E-09	2.8E-06	24.0	307.1	8.8
BP441	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/P271G/A330R	1.7E-08	3.6E-07	8.8E-06	1.5E-08	3.7E-06	24.0	592.8	3.0
BP442	E233D/G237D/P238D/H268E/E269D/P271G/A330R	4.5E-08	3.8E-07	4.7E-06	1.2E-08	2.5E-06	30.6	379.0	2.9
BP443	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/E269D/P271G/A330R	1.8E-08	5.1E-07	9.5E-06	2.3E-08	2.3E-06	21.7	406.0	2.2
BP445	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R	2.0E-08	8.0E-08	1.5E-06	2.6E-08	2.4E-06	31.0	581.4	13.8
BP479	E233D/G237D/P238D/V264I/V266L/S267A/H268E/P271G	5.3E-08	9.0E-07	1.5E-06	5.6E-08	4.0E-06	16.1	288.3	1.2
BP480	E233D/G237D/P238D/V266L/H268E/E269D/P271G	1.3E-08	6.3E-06	2.1E-06	2.0E-07	4.6E-06	32.1	107.7	0.2
BP481	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G	1.0E-08	4.0E-07	6.8E-06	1.9E-08	2.4E-06	20.5	350.5	2.8
BP483	E233D/G237D/P238D/V266L/S267A/H268E/P271G	1.3E-08	1.3E-06	1.8E-06	7.8E-08	2.5E-06	16.8	230.8	0.8
BP484	E233D/G237D/P238D/S267A/H268E/E269D/P271G	8.2E-10	7.8E-07	1.1E-06	4.6E-08	2.5E-06	17.1	240.7	1.4
BP487	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R/P396M	1.2E-08	3.9E-08	9.4E-07	1.2E-08	1.0E-06	30.8	730.4	20.3
BP488	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	2.2E-08	7.4E-08	1.8E-06	1.9E-08	2.0E-06	40.1	864.9	14.8
BP489	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M	1.3E-08	4.3E-08	8.7E-07	1.0E-08	1.2E-06	42.8	870.0	25.7
BP490	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R	4.5E-08	1.1E-07	2.4E-06	2.4E-08	2.9E-06	46.7	1000.0	9.8
BP491	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	5.3E-08	1.2E-07	2.2E-06	3.0E-08	3.1E-06	38.8	723.7	9.3
BP492	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G	7.9E-10	9.2E-07	1.6E-06	2.4E-08	3.6E-06	30.9	678.0	1.2
BP493	P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	8.2E-10	1.1E-06	1.9E-06	2.1E-08	3.5E-06	52.1	900.5	1.0
BP494	G237D/P238D/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	3.9E-08	2.5E-07	7.4E-06	6.6E-09	4.0E-06	30.6	820.7	4.3
BP495	G237D/P238D/S267G/H268E/P271G/Y296D/A330R	8.8E-08	4.9E-07	1.2E-05	9.7E-09	3.3E-06	50.9	1243.5	2.2
BP496	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	1.2E-08	4.7E-07	3.7E-06	1.9E-08	3.0E-06	25.3	207.1	2.3
BP497	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R	2.1E-08	8.6E-08	9.8E-07	4.1E-08	2.8E-06	21.0	236.5	12.9
BP498	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R/P396L	1.3E-08	5.1E-08	9.3E-07	1.7E-08	1.0E-06	30.8	553.6	21.7
BP499	E233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L	1.2E-08	4.9E-08	1.0E-06	1.5E-08	1.2E-06	39.8	694.9	22.3

NOMBRE DE VARIANTE	ALTERACIÓN	KD FRENTE A FcγRIa (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIaR (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIb (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIb (mol/L)	KD FRENTE A FcγRIIaV (mol/L)	KD(IIR) DEL POLIPEPTIDO ORIGINAL/ KD(IIR) DEL POLIPEPTIDO ALTERADO	KD(IIB) DEL POLIPEPTIDO ORIGINAL/ KD(IIB) DEL POLIPEPTIDO ALTERADO
BP500	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	2.3E-08	7.2E-07	2.5E-05	2.4E-08	3.9E-05	1033.1	128.1
BP501	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G	2.1E-08	6.3E-07	1.4E-05	2.5E-08	1.9E-05	555.6	123.0
BP502	P233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R	2.1E-08	1.1E-07	1.3E-06	3.7E-08	2.4E-05	29.5	840.1
BP503	P233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M	1.2E-08	5.7E-08	8.6E-07	1.7E-08	2.1E-05	33.2	1812.9
BP504	P233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	1.4E-08	4.5E-07	1.8E-05	2.4E-08	3.4E-05	19.5	127.6
BP505	P233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	1.1E-08	4.3E-07	1.1E-05	2.1E-08	3.0E-05	20.0	144.9
BP506	P233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	3.1E-08	1.2E-07	2.5E-08	3.4E-08	5.5E-05	35.1	806.4
BP507	P233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	2.8E-08	1.0E-07	1.8E-06	2.9E-08	2.6E-05	34.2	1065.3
BP508	P233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	1.4E-08	5.4E-07	2.0E-05	2.1E-08	6.1E-05	26.0	149.0
BP509	P233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	1.1E-08	5.2E-07	7.9E-06	1.8E-08	2.3E-05	29.2	174.2
BP510	P233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	6.0E-08	1.7E-07	4.0E-06	3.8E-08	2.5E-05	43.5	807.3
BP511	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	6.0E-08	1.8E-07	4.3E-06	3.5E-08	7.1E-05	50.6	880.8
BP531	P233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M	9.4E-08	1.2E-07	3.5E-06	3.8E-08	2.7E-05	33.1	826.7
BP532	P233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396M	1.2E-08	9.4E-08	1.8E-06	3.2E-08	2.6E-05	29.3	368.8
BP533	P233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L	7.7E-08	1.2E-07	2.6E-06	4.1E-08	2.7E-05	29.3	694.1
BP534	P233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R/P396L	9.3E-08	9.1E-08	1.8E-06	3.0E-08	2.5E-05	30.7	606.1
BP535	P233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M	1.1E-08	9.2E-08	9.2E-06	4.0E-08	3.9E-05	23.2	606.0
BP536	P233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A327G/A330R/P396M	8.9E-08	7.8E-08	1.3E-06	5.0E-08	2.8E-05	26.6	437.7
BP537	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R	2.8E-08	2.7E-07	3.1E-06	6.9E-08	3.8E-05	39.1	447.3
BP538	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R	5.5E-08	2.0E-07	3.0E-06	5.3E-08	3.0E-05	30.6	560.2
BP539	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	8.4E-08	3.3E-07	5.8E-06	8.4E-08	3.4E-05	39.0	666.7
BP540	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	9.8E-08	2.1E-07	4.8E-06	5.7E-08	3.9E-05	36.8	602.8
BP549	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/A330R	1.8E-08	5.7E-07	1.1E-05	1.6E-08	2.4E-05	35.9	696.2
BP550	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	2.8E-08	3.4E-07	5.0E-06	7.6E-08	4.8E-05	44.2	655.3
BP551	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	3.2E-08	2.5E-07	2.8E-06	6.4E-08	4.8E-05	38.1	435.5
BP552	P233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	3.2E-08	9.7E-08	1.9E-06	2.6E-08	3.0E-05	37.3	733.6
BP553	P233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	9.4E-08	8.6E-08	1.4E-06	3.1E-08	2.0E-05	27.8	453.1
BP554	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	8.0E-08	1.5E-07	2.3E-06	4.4E-08	2.4E-05	32.7	518.0
BP555	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	9.4E-08	1.6E-07	3.2E-06	4.1E-08	3.0E-05	39.7	778.6
BP556	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	4.3E-08	3.0E-07	5.8E-06	8.4E-08	6.0E-05	35.4	692.1
BP557	P233D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	1.3E-08	8.5E-07	1.5E-05	2.0E-08	2.8E-05	42.0	746.3
BP558	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	1.3E-08	3.3E-07	4.9E-06	9.0E-08	3.6E-05	36.4	543.2
BP559	P233D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	1.1E-08	1.6E-06	2.0E-05	2.8E-08	4.4E-05	53.4	711.7
BP560	P233D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	5.8E-08	4.2E-06	3.1E-05	1.8E-07	4.1E-05	22.8	168.5
BP561	P233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	8.4E-08	5.1E-07	5.3E-06	1.8E-08	3.7E-05	28.0	281.2
BP562	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	2.8E-08	6.8E-07	1.1E-05	2.4E-08	5.3E-05	29.0	466.1
BP563	P233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	1.2E-08	4.6E-07	8.3E-06	1.6E-08	3.8E-05	23.1	525.3
BP564	G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	3.1E-08	5.8E-07	1.0E-05	2.2E-08	4.9E-05	28.2	454.5
BP565	P233D/G237D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D/A330R	2.4E-08	2.8E-07	4.7E-06	2.1E-08	2.1E-05	41.5	556.1
BP567	P233D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G/Y296D	2.1E-10	8.9E-07	1.7E-05	1.4E-08	3.9E-05	64.4	131.9
BP568	P233D/P238D/V264I/S267A/H268E/P271G	1.9E-10	6.8E-07	1.1E-05	1.5E-08	2.5E-05	46.1	749.3
BP569							11.4	1196.9
BP570							12.8	1003.2
BP571							7.6	698.2
BP572							6.7	754.3
BP573							3.7	369.9
BP574							1.3	154.2
BP575							3.4	343.7
BP576							0.7	110.3
BP577							0.3	16.8
BP578							2.2	170.3
BP579							1.6	131.4
BP580							2.4	196.2
BP581							1.9	140.9
BP582							4.8	564.7
BP583							1.2	224.6
BP584							1.6	210.9

De las variantes mostradas en la Tabla 27, IL6R-BP253/IL6R-L con las alteraciones existentes añadidas que mejoran la unión a FcγRIIb presentó actividades de unión a FcγRIIb y FcγRIIaR aumentadas a 277 veces y 529 veces las de IL6R-B3/IL6R-L antes de introducir las alteraciones, respectivamente. Además, la actividad de unión a FcγRIa de IL6R-

BP253/IL6R-L también era mayor que la de IL6R-B3/IL6R-L. Por otro lado, la unión a FcγRIIIaH y la unión a FcγRIIIaV de IL6R-BP253/IL6R-L se redujeron en comparación con las de IL6R-B3/IL6R-L. Entre otras variantes, IL6R-BP436/IL6R-L e IL6R-BP438/IL6R-L mostraban una unión a FcγRIa ligeramente mejorada en comparación con IL6R-B3/IL6R-L antes de introducir las alteraciones. Todas las demás variantes mostraban una unión reducida de FcγRIa. Además, todas las variantes presentaban unión a FcγRIIIaH y unión a FcγRIIIaV reducidas en comparación con las de IL6R-B3/IL6R-L.

En relación con IL6R-BP489/IL6R-L, IL6R-BP487/IL6R-L, IL6R-BP499/IL6R-L, IL6R-BP498/IL6R-L, IL6R-BP503/IL6R-L, IL6R-BP488/IL6R-L, IL6R-BP490/IL6R-L, IL6R-BP445/IL6R-L, IL6R-BP552/IL6R-L, IL6R-BP507/IL6R-L, IL6R-BP536/IL6R-L, IL6R-BP534/IL6R-L, IL6R-491/IL6R-L, IL6R-BP553/IL6R-L, IL6R-BP532/IL6R-L, IL6R-BP506/IL6R-L, IL6R-BP511/IL6R-L, IL6R-BP502/IL6R-L, IL6R-BP531/IL6R-L, IL6R-BP510/IL6R-L, IL6R-BP535/IL6R-L, IL6R-BP497/IL6R-L, IL6R-BP533/IL6R-L, IL6R-BP555/IL6R-L, IL6R-BP554/IL6R-L, IL6R-BP436/IL6R-L, IL6R-BP423/IL6R-L, IL6R-BP440/IL6R-L, IL6R-BP538/IL6R-L, IL6R-BP429/IL6R-L, IL6R-BP438/IL6R-L, IL6R-BP565/IL6R-L, IL6R-BP540/IL6R-L, IL6R-BP426/IL6R-L, IL6R-BP437/IL6R-L, IL6R-BP439/IL6R-L, IL6R-BP551/IL6R-L, IL6R-BP494/IL6R-L, IL6R-BP537/IL6R-L, IL6R-BP550/IL6R-L, IL6R-BP556/IL6R-L, IL6R-BP539/IL6R-L, IL6R-BP558/IL6R-L, IL6R-BP425/IL6R-L y IL6R-BP495/IL6R-L, su unión a FcγRIIb era mayor que la de IL6R-BP253/IL6R-L con la alteración existente añadida que mejora la unión a FcγRIIb. De los anteriores, la mejora de la unión a FcγRIIb varía de 321 veces (la más baja) a 3100 veces (la más alta), en comparación con la unión de IL6R-B3/IL6R-L (que se define como 1), de IL6R-BP495/IL6R-L a IL6R-BP489/IL6R-L, respectivamente. Por lo tanto, se puede decir que estas variantes son superiores tanto en el nivel como en la selectividad de mejora de la actividad de unión a FcγRIIb en comparación con la técnica anterior.

La comparación de las variantes producidas en este examen con la variante existente IL6R-BP253/IL6R-L que tiene una unión a FcγRIIb mejorada mostró que el valor de KD (IIaH)/KD (IIb) es 16.1 para IL6R-BP479/IL6R-L, que mostraba el valor más bajo, y es 64.4 para IL6R-BP567/IL6R-L que mostraba el valor más alto, y los valores para todas las variantes eran superiores a 0.2 para IL6R-BP253/IL6R-L. Además, el valor de KD (IIaH)/KD (IIb) es 107.7 para IL6R-BP480/IL6R-L que mostraba el valor más bajo y es 8362 para IL6R-BP426/IL6R-L que mostraba el valor más alto, y los valores para todas las variantes eran superiores a 107.1 para IL6R-BP253/IL6R-L. A partir de estos resultados, se ha mostrado que todas las variantes mostradas en la Tabla 27 son variantes con selectividad mejorada para FcγRIIb en comparación con la variante conocida en la que se introducen la o las alteraciones para mejorar la unión a FcγRIIb. En particular, IL6R-BP559/IL6R-L, IL6R-BP493/IL6R-L, IL6R-BP557/IL6R-L, IL6R-BP492/IL6R-L y IL6R-BP500/IL6R-L tienen todos unión a FcγRIIIaR mantenida a no más de 1.5 veces la de IL6R-B3/IL6R-L, y al mismo tiempo la actividad de unión a FcγRIIb aumentaba en 100 veces; por lo tanto, se esperaba que estas variantes mostraran efectos producidos por la unión mejorada a FcγRIIb mientras que evitaran los efectos secundarios causados por la unión mejorada a FcγRIIIaR. Por consiguiente, se puede considerar que estas variantes tienen mejores propiedades en términos de actividades de unión y selectividad de FcγRIIb que los anticuerpos producidos por técnicas existentes.

Sin estar limitados por una teoría particular, las variantes IL6R-BP568/IL6R-L y IL6R-BP492/IL6R-L que tienen la secuencia de Tregitope conservada que tiene una mayor capacidad inductora de Treg (De Groot et al. (*Blood* (2008) 112, 3303-3311)) y, por lo tanto, se considera que tiene una alta actividad inductora de Treg que las variantes que tienen Y296D, IL6R-BP567/IL6R-L e IL6R-BP493/IL6R-L, pueden ser más efectivas. Con respecto a la actividad de unión y la selectividad de estas variantes para FcγRIIb, la comparación con el tipo natural muestra que la unión a FcγRIIIaR es 1.6 veces y la unión a FcγRIIb es 211 veces la del tipo natural para IL6R-BP568/IL6R-L, y la unión a FcγRIIIaR es 1.2 veces y la unión a FcγRIIb es 131 veces la del tipo natural para IL6R-BP492/IL6R-L, y se encontró que estas variantes tienen una alta actividad de unión y selectividad para FcγRIIb.

Ejemplo 20. Preparación de anticuerpos que se unen a IgA humana de una manera dependiente de calcio

(20-1) Preparación de IgA humana (hIgA)

Los ejemplos 2 a 4 muestran que las moléculas que tienen una unión a FcγR de ratón mejorada y que se unen de manera dependiente del pH al receptor de IL-6 humano como antígeno, pueden reducir significativamente la concentración del antígeno en el plasma. Después, se realizó un ensayo adicional usando anticuerpos contra la IgA humana como antígeno, con el fin de evaluar la presencia de un efecto similar a eliminar antígenos solubles del plasma en un organismo vivo al que se han administrado anticuerpos que tienen una unión a FcγR de ratón mejorada y que se unen de una manera dependiente del pH a antígenos distintos del receptor de IL-6 humano. El antígeno, la IgA humana (en lo sucesivo, también denominado hIgA) (su región variable es de un anticuerpo anti-IL6R humano) se preparó usando la siguiente técnica de recombinación. La hIgA se expresó cultivando células hospedantes que contenían vectores recombinantes que portaban H (WT)-IgA1 (SEQ ID NO: 65) y L (WT)-CK (SEQ ID NO: 42), y se purificó por un método conocido por los expertos en la técnica usando cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de filtración en gel.

(20-2) Expresión y purificación de un anticuerpo que se une a hIgA

GA2-IgG1 (cadena pesada, SEQ ID NO: 66; cadena ligera, SEQ ID NO: 67) es un anticuerpo que se une a hIgA. Se insertó una secuencia de ADN que codifica GA2-IgG1 (cadena pesada, SEQ ID NO: 66; cadena ligera, SEQ ID NO:

67) en un plásmido de expresión de células animales por un método conocido por los expertos en la técnica. El anticuerpo se expresó y purificó por el método descrito a continuación. Las células de la línea FreeStyle 293-F derivada de células de riñón fetal humano (Invitrogen) se suspendieron en medio de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen). La suspensión celular se puso en placas con una densidad celular de 1.33×10^6 células/ml en 3 ml en cada pocillo de una placa de 6 pocillos. Después, el plásmido preparado se introdujo en las células por el método de lipofección. Las células se cultivaron en una incubadora de CO₂ (37°C, 8% de CO₂, 90 rpm) durante 4 días. A partir del líquido sobrenadante del cultivo aislado, el anticuerpo se purificó por un método conocido por los expertos en la técnica usando rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences). La absorbancia (longitud de onda: 280 nm) de la solución del anticuerpo purificado se midió usando un espectrofotómetro. La concentración de anticuerpos se determinó usando el coeficiente de extinción calculado a partir del valor medido por el método PACE (*Protein Science* (1995) 4, 2411-2423).

(20-3) Evaluación del anticuerpo aislado para determinar su capacidad de unión a hlgA dependiente de calcio

Se evaluó el anticuerpo aislado como se describe en el Ejemplo (20-2) para determinar su actividad de unión a hlgA (constante de disociación, KD (M)) usando Biacore T200 (GE Healthcare). La actividad de unión se midió usando como un tampón de análogos, tween20 al 0.05%, ACES 20 mmol/l, NaCl 150 mmol/l (pH 7.4 o pH 5.8) que contenía CaCl₂ 3 µM o 1,2 mM. Se inmovilizó una cantidad adecuada de proteína A/G recombinante (Thermo Scientific) sobre un chip sensor CM5 (GE Healthcare) por un método de acoplamiento de aminoácidos, y se permitió que el anticuerpo se uniera al mismo. Después, se inyectó una concentración adecuada de hlgA (descrita en (A1-1)) como analito y se permitió que interaccionara con el anticuerpo sobre el chip sensor. La medición se llevó a cabo a 37°C. Después de la medición, se inyectó glicina-HCl 10 mmol/l (pH 1.5) para regenerar el chip sensor. A partir del resultado de la medición, se calculó la constante de disociación KD (M) por análisis de ajuste de curva y análisis de equilibrio usando el software de evaluación Biacore T200 (GE Healthcare). El resultado se muestra en la Tabla 28. GA2-IgG1 se unía fuertemente a la hlgA a una concentración de Ca²⁺ de 1,2 mM, y se unía débilmente a la hlgA a una concentración de Ca²⁺ de 3 µM. Por otro lado, a una concentración de Ca²⁺ de 1,2 mM, GA2-IgG1 se unía fuertemente a la IgA humana a pH 7.4, y se unió débilmente a la IgA humana a pH 5.8. En resumen, se demostró que GA2-IgG1 se une a la IgA humana de manera dependiente del pH y el calcio.

Tabla 28

Nombre del anticuerpo	Condiciones	Ajuste	ka	kd	KD[M]
GA2-IgG1	pH7.4, 1.2 mM Ca	modelo de unión 1:1	4.0E+05	1.6E-02	3.9E-08
	pH7.4, 3 µM Ca	Afinidad en estado estacionario	-	-	6.7E-06
	pH5.8, 1.2 mM Ca	Afinidad en estado estacionario	-	-	4.0E-06
	pH5.8, 3 µM Ca	Afinidad en estado estacionario	-	-	5.0E-06

Ejemplo 21. Preparación de variantes de anticuerpos que se unen a la hlgA de una manera dependiente de calcio

A continuación, para acelerar todavía más la eliminación del antígeno (hlgA) del plasma, se produjo GA2-F1087 (cadena pesada, SEQ ID NO: 68) sustituyendo la Leu por Tyr en la posición 328 (numeración EU) en GA2-IgG1 para mejorar la unión a FcγR de ratón de GA2-IgG1 que se une a la hlgA de manera dependiente del calcio. Se insertó una secuencia de ADN que codifica GA2-F1087 (cadena pesada, SEQ ID NO: 68; cadena ligera, SEQ ID NO: 67) en un plásmido de expresión animal por un método conocido por los expertos en la técnica. Las variantes de anticuerpos se expresaron por el método descrito antes usando el plásmido. Las concentraciones de las variantes se midieron después de la purificación. Los anticuerpos que comprenden la alteración anterior presentaban una unión a FcγR de ratón significativamente aumentada, como se muestra en el ejemplo (4-3).

Ejemplo 22. Evaluación del efecto sobre la retención de antígeno en el plasma en ratones normales a los que se administró anticuerpos de unión a hlgA dependientes de Ca

(22-1) Ensayos in vivo con ratones normales

Se administró hlgA (IgA humana, preparada como se describe en el ejemplo (20-1)) sola o en combinación con un anticuerpo anti-hlgA a ratones normales (ratón C57BL/6J, Charles River Japón). Después de la administración, se evaluó la dinámica in vivo de hlgA y los anticuerpos anti-hlgA. Una solución de hlgA (80 µg/ml) o una solución mixta de hlgA y un anticuerpo anti-hlgA se administraron una vez en una dosis de 10 ml/kg en la vena caudal. Los anticuerpos anti-hlgA usados eran GA2-IgG1 y GA2-F1087 descritos antes.

En todas las soluciones mixtas, la concentración de hlgA era 80 µg/ml, y la concentración de anticuerpo anti-hlgA era 2.69 mg/ml. En este experimento, los anticuerpos anti-hlgA estaban presentes significativamente en exceso frente a hlgA, y por lo tanto se pensó que la mayoría de la hlgA se unía a los anticuerpos. En el grupo de los ratones al que se administró GA-hlgG1, se recogió la sangre cinco minutos, siete horas, un día, dos días, tres días y siete días después de la administración. Por otro lado, en el grupo de los ratones al que se administró GA-F1087, se recogió la sangre

cinco minutos, 30 minutos, una hora, dos horas, un día, tres días y siete días después de la administración. La sangre recogida se centrifugó inmediatamente a 12 000 rpm y 4°C durante 15 minutos para aislar el plasma. El plasma aislado se almacenó en un congelador a -20°C o menos hasta su uso.

(22-2) Determinación de la concentración plasmática de anticuerpos anti-hIgA en ratones normales por el método ELISA

Las concentraciones de anticuerpos anti-hIgA en el plasma de ratón se midieron por el método ELISA. Primero, para preparar una placa con anti-IgG humana inmovilizada, un fragmento de anticuerpo F(ab')₂ anti-IgG humana (específico de cadena γ) (SIGMA) se distribuyó en partes alícuotas a cada pocillo de una placa Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp (Nalge nunc International), y la placa se dejó reposar a 4°C durante la noche. Las muestras de la curva de calibración del anticuerpo anti-hIgA preparadas como soluciones de referencia para la concentración plasmática (0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125, 0.01563 y 0.007813 $\mu\text{g/ml}$) y las muestras de ensayo de plasma de ratón diluido 100 veces o más, se repartieron en partes alícuotas en la placa con anti-IgG humana inmovilizada mencionada antes. Después de una hora de incubación de la placa a 25°C, el conjugado de anticuerpo de cabra anti-IgG humana (específica de cadena γ) y biotina (BIOT) (Southern Biotechnology Associates Inc.) se repartió en partes alícuotas en cada pocillo de la placa. Después, la placa se incubó a 25°C durante una hora. A continuación, se repartió en partes alícuotas estreptavidina-PoliHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) en cada pocillo de la placa. Después, la placa se incubó a 25°C durante una hora. La reacción cromogénica se llevó a cabo usando como sustrato TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories). Después de terminar la reacción con ácido sulfúrico 1 N (Showa Chemical), se midió la absorbancia de la solución de reacción en cada pocillo a 450 nm con un lector de microplacas. Las concentraciones de anticuerpos anti-hIgA en el plasma de ratón se determinaron basándose en la absorbancia de la curva de referencia usando el software de análisis SOFTmax PRO (Molecular Devices). En la Fig. 40 se muestra una evolución temporal de las concentraciones de anticuerpos de GA2-IgG1 y GA2-F1087 en el plasma de ratones normales después de la administración intravenosa, que se midieron por el método descrito antes. Los resultados demuestran que, con respecto al clon GA2-IgG1 que tiene una fuerte actividad de unión a hIgA dependiente del pH, la concentración plasmática del anticuerpo no se reduce significativamente incluso si se mejora la unión a Fc γ R.

(22-3) Determinación de la concentración plasmática de hIgA por el método ELISA

Las concentraciones de hIgA en el plasma de ratón se midieron por el método ELISA. Primero, para preparar una placa con anti-IgA humana inmovilizada, el anticuerpo de cabra anti-IgA humana (BETHYL) se repartió en partes alícuotas en cada pocillo de una placa Nunc-Immuno, MaxiSoup (Nalge nunc International), y la placa se dejó en reposo a 4°C durante la noche. Las muestras de la curva de calibración de hIgA se prepararon como soluciones de referencia para la concentración plasmática (0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 y 0.00625 $\mu\text{g/ml}$), y se usaron. Se combinaron 100 μl de cada una de las muestras de la curva de calibración y muestras de ensayo de plasma de ratón diluido 100 veces o más, con 200 μl de hL6R 500 ng/ml. Esto se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante una hora. Después, 100 μl de las mezclas se repartieron en partes alícuotas en la placa con anti-IgA humana inmovilizada. La placa se dejó reposar a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, el anticuerpo biotinilado anti-IL-6 R humano (R&D) se repartió en partes alícuotas en cada pocillo de la placa. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, se repartió en partes alícuotas estreptavidina-PoliHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) en cada pocillo de la placa. La placa se incubó a temperatura ambiente durante una hora. La reacción cromogénica se llevó a cabo usando como sustrato TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories). Después de terminar la reacción con ácido sulfúrico 1 N (Showa Chemical), se midió la absorbancia de la solución de reacción en cada pocillo a 450 nm con un lector de microplacas. Las concentraciones en el plasma de ratón se determinaron basándose en la absorbancia de la curva de referencia usando el software de análisis SOFTmax PRO (Molecular Devices). En la Fig. 41 se muestra una evolución temporal de la concentración de hIgA en el plasma de ratones normales después de la administración intravenosa, que se midió por el método anterior.

El resultado mostraba que, en ratones a los que se administró hIgA en combinación con GA2-IgG1 que tiene una actividad de unión a hIgA dependiente de Ca de 100 veces o más, la eliminación de hIgA se aceleró en comparación con la administración de hIgA sola. Por otro lado, en el plasma de ratones a los que se administró GA2-F1087 con unión mejorada a hIgA y Fc γ R, la concentración de hIgA se redujo por debajo del intervalo medible (0.006 $\mu\text{g/ml}$ o más) un día después de la administración, y por lo tanto la eliminación de hIgA estaba significativamente acelerada en comparación con el plasma de ratones a los que se administró GA-IgG1. Los hallazgos descritos en los Ejemplos 2 a 7 anteriores demuestran el aumento del efecto de eliminación de antígeno de los anticuerpos con unión a Fc γ R mejorada en ratones a los que se administró IL6R y anticuerpo anti-IL6R. Del mismo modo, también se demostró un efecto similar en ratones a los que se administró el antígeno hIgA y el anticuerpo anti-hIgA. A partir de los resultados obtenidos hasta ahora en los ejemplos, la eliminación de antígeno en este caso también puede ser mediada por Fc γ RIIb.

Ejemplo 23. Preparación de un anticuerpo anti-IgE dependiente del pH

(23-1) Preparación de un anticuerpo anti-IgE humana

Para preparar un anticuerpo anti-IgE humana dependiente del pH, la IgE humana (cadena pesada, SEQ ID NO: 69; cadena ligera, SEQ ID NO: 70) (su región variable es de un anticuerpo anti-glipicano 3 humano) se expresó como un

antígeno usando FreeStyle293 (Life Technologies). La IgE humana expresada se preparó y purificó por un método cromatográfico general conocido por los expertos en la materia. Se seleccionó un anticuerpo que se une a la IgE humana de manera dependiente del pH de muchos anticuerpos aislados. Las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo anti-IgE humana seleccionado se fusionaron con una región constante de la cadena pesada de IgG1 humana y una región constante de la cadena ligera humana, y el gen del anticuerpo resultante se insertó en un vector. Usando el vector, se expresó y purificó un anticuerpo anti-IgE humana recombinante. El anticuerpo preparado se denominó clon 278 (en lo sucesivo denominado 278-IgG1; cadena pesada, SEQ ID NO: 71, cadena ligera, SEQ ID NO: 72).

(23-2) Evaluación del anticuerpo anti-IgE humana para determinar la actividad de unión a IgE humana y la actividad de unión dependiente del pH

Los anticuerpos capaces de disociar antígenos en el endosoma se pueden producir de tal manera que se unan a los antígenos no solo de una manera dependiente del pH sino también de una manera dependiente del Ca. Así, 278-IgG1 y el anticuerpo de control de IgG1 humana Xolair (omalizumab, Novartis) sin capacidad de unión a IgE dependiente de pH/Ca, se evaluaron para determinar la capacidad de unión dependiente del pH y la capacidad de unión dependiente del pH/Ca a la IgE humana (hIgE). Específicamente, 278-IgG1 y Xolair se evaluaron para determinar su actividad de unión a hIgE (constante de disociación, KD (M)) usando Biacore T200 (GE Healthcare). Las mediciones se llevaron a cabo usando los siguientes tres tipos de tampones de análisis:

- CaCl₂ 1.2 mmol/l, tween20 al 0.05%, ACES 20 mmol/l, NaCl 150 mmol/l, pH 7.4

- CaCl₂ 1.2 mmol/l, tween20 al 0.05%, ACES 20 mmol/l, NaCl 150 mmol/l, pH 5.8

- CaCl₂ 3 µmol/l, tween20 al 0.05%, ACES 20 mmol/l, NaCl 150 mmol/l, pH 5.8

Se cargó una cantidad adecuada de un péptido (en lo sucesivo denominado "péptido GPC3 biotinilado") que resulta de la adición de biotina a la Lys C-terminal de una secuencia sintetizada químicamente derivada de la proteína glicpiano 3 humana (SEQ ID NO: 73) en un chip sensor SA (GE Healthcare), y se inmovilizó en el chip sensor SA por la afinidad biotina/estreptavidina. Se inyectó una concentración adecuada de IgE humana y se capturó mediante GPC3 biotinilado para inmovilizar la IgE humana sobre el chip. Se inyectó una concentración adecuada de 278-IgG1 como analito, y se permitió que interaccionara con la IgE humana sobre el chip sensor. Después, se inyectó glicina-HCl 10 mmol/l (pH 1.5) para regenerar el chip sensor. Todo el ensayo para la interacción se realizó a 37°C. Usando el software de evaluación Biacore T200 (GE Healthcare), los resultados del ensayo se analizaron por ajuste de curva para determinar la constante de velocidad de unión ka (1/MS) y la constante de velocidad de disociación kd (1/s). La constante de disociación KD (M) se calculó a partir de las constantes anteriores. Después, la unión dependiente del pH se evaluó calculando la relación KD de cada anticuerpo entre las condiciones de pH 5.8/Ca 1.2 mM y pH 7.4/Ca 1.2 mM. La unión dependiente de pH/Ca se evaluó calculando la relación de KD de cada anticuerpo entre las condiciones de pH 5.8/Ca 3 µM y pH 7.4/Ca 1.2 mM. Los resultados se muestran en la Tabla 29.

Tabla 29

Nombre del anticuerpo (abreviado)	Condiciones de tampón	ka (1/MS)	kd (1/s)	KD (M)	Dependencia de pH	Dependencia de pH/Ca
					KD(pH 5.8, Ca 1.2 mM) /KD(pH 7.4, Ca 1.2 mM)	KD(pH 5.8, Ca 3 µM) /KD (pH 7.4, Ca 1.2 mM)
Clon 278	pH 7.4, Ca 1.2 mM	1.5E+06	3.6E-03	2.4E-09	842.5	1636.5
	pH 5.8, Ca 1.2 mM	1.2E+05	2.3E-01	2.0E-06		
	pH 5.8, Ca 3 µM	6.2E+04	2.4E-01	3.9E-06		
Xolair	pH 7.4, Ca 1.2 mM	2.5E+06	1.1E-02	4.4E-09	2.3	2.9
	pH 5.8, Ca 1.2 mM	2.4E+06	2.4E-02	9.9E-09		
	pH 5.8, Ca 3 µM	1.4E+06	1.7E-02	1.3E-08		

Ejemplo 24. Preparación de una variante de anticuerpo que se une a la IgE humana de una manera dependiente del pH

A continuación, para acelerar todavía más la eliminación de antígeno (IgE humana) del plasma, se insertó una secuencia de ADN que codifica 278-F1087 (cadena pesada, SEQ ID NO: 74; cadena ligera, SEQ ID NO: 72) con una sustitución de Leu por Tyr en la posición 328 (numeración EU) en 278-IgG1 en un plásmido de expresión animal por un método conocido por los expertos en la técnica, con el fin de mejorar la unión a FcγR de ratón de 278-IgG1 que se une a la IgE humana en una manera dependiente del pH. Las variantes de anticuerpos se expresaron por el método mencionado antes usando células animales con el plásmido introducido. Las concentraciones de las variantes de anticuerpos se determinaron después de la purificación.

Ejemplo 25. Evaluación in vivo de 278-IgG1

(25-1) Preparación de IgE humana (hIgE (Asp6)) para la evaluación in vivo

hIgE (Asp6) (su región variable es de un anticuerpo anti-glicoproteína 3 humano), que es una IgE humana para la evaluación in vivo, que consiste en la cadena pesada (SEQ ID NO: 75) y la cadena ligera (SEQ ID NO: 70), se preparó por el mismo método que se describe en el Ejemplo (23-1). hIgE (Asp6) es una molécula en la que la asparagina se ha reemplazado por ácido aspártico en los seis sitios de N-glicosilación en la IgE humana, de modo que los cambios dependientes del tiempo en la concentración de IgE humana como antígeno en el plasma no afectan a la heterogeneidad de cadenas de azúcar unidas a N de la IgE humana.

(25-2) Evaluación del efecto de acelerar la eliminación de IgE humana del plasma de ratones normales a los que se administró el clon 278

Como se describe en los ejemplos 2 a 4 y 22, se demostró que la concentración de antígeno se reducía significativamente en el plasma de ratones a los que se administraron las moléculas que se unen de manera dependiente del pH al receptor de IL-6 humano o a la IgA humana como antígeno, y cuya unión a FcγR de ratón se ha mejorado. Se realizó una prueba adicional usando anticuerpos contra IgE humana como antígeno para evaluar si había un efecto similar de eliminar antígenos solubles del plasma de un organismo vivo al que se administran anticuerpos con unión a FcγR de ratón mejorada que se unen de manera dependiente del pH a antígenos distintos del receptor de IL-6 humano y la IgA humana, cuando se mejora la unión al FcγR de ratón.

Se evaluaron la hIgE (Asp6) y anticuerpos anti-IgE humana para determinar su dinámica in vivo después de la administración de hIgE (Asp6) sola, o hIgE (Asp6) en combinación con los anticuerpos anti-hIgE (278-IgG1 y 278-F1087) a ratones C57BL/6J (Charles river, Japón). La hIgE (Asp6) (20 µg/ml) o una mezcla de hIgE (Asp6) y un anticuerpo anti-IgE humana se administraron una vez con 10 ml/kg en la vena caudal (como se describe en la Tabla 30, todos los anticuerpos se prepararon en la misma concentración). En este caso, cada anticuerpo estaba presente significativamente en exceso frente a la hIgE (Asp6) y, por lo tanto, se creía que casi toda la hIgE (Asp6) se unía al anticuerpo. En el grupo de los ratones al que se administró el clon 278 (278-IgG1), se recogió la sangre cinco minutos, dos horas, siete horas, un día, dos días, cuatro días, cinco días, siete días, 14 días y 21 días después de la administración. En el grupo de los ratones al que se administró 278-F1087, se recogió la sangre cinco minutos, 30 minutos, una hora, dos horas, un día, tres días, siete días, 14 días y 21 días después de la administración. La sangre recogida se centrifugó inmediatamente a 15 000 rpm y 4°C durante 5 minutos para aislar el plasma. El plasma aislado se almacenó en un congelador a -20°C o menos hasta su uso.

Tabla 30

Anticuerpo anti-IgE	Concentración de hIgE (Asp6) en la solución administrada (µg/ml)	Concentración de anticuerpo anti-hIgE en la solución administrada (µg/ml)
278-IgG1	20	100
278-F1087	20	100

(25-3) Determinación de la concentración plasmática de anticuerpos anti-IgE humana en ratones normales

Las concentraciones de anticuerpos anti-hIgE en el plasma de ratón se midieron por el método ELISA. Se prepararon muestras de la curva de referencia a 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125 y 0,00625 µg/ml para las concentraciones plasmáticas. Para asegurar la homogeneidad del complejo inmunitario entre la hIgE (Asp6) y el anticuerpo anti-hIgE, se añadió hIgE (Asp6) en 1 µg/ml a las muestras de curva de referencia y las muestras de ensayo de plasma de ratón. Las muestras del grupo de administración 278-hIgG1 y las muestras de la curva de referencia correspondientes se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Por otro lado, las muestras del grupo de administración 278-F1087 y las muestras de la curva de referencia correspondientes se agitaron a 37°C durante la noche. Después de incubación o agitación, las muestras de la curva de referencia y las muestras de ensayo de plasma de ratón se distribuyeron en partes alícuotas en un inmunoplate (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp (Nalge nunc International)) con anticuerpo anti-cadena ligera Kappa humana inmovilizado (Bethyl Laboratories), y esto era se dejó reposar/agitó a temperatura ambiente durante dos horas (las muestras del grupo de administración 278-F1087 y las muestras de la curva de referencia de 278-F1087), o se dejó reposar a 4°C durante la noche (las muestras del grupo de administración 278-hIgG1 y las muestras de la curva de referencia de 278-hIgG1). Después, el anticuerpo secundario de conejo anti-IgG (Fc), el conjugado con biotina (Pierce Biotechnology) y estreptavidina-Poli HRP80 (Stereospecific Detection Technologies) se hizo reaccionar cada uno sucesivamente durante una hora. La reacción cromogénica se llevó a cabo usando como sustrato TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories). Después de terminar la reacción con ácido sulfúrico 1 N (Showa Chemical), las concentraciones en el plasma de ratón se determinaron basándose en el desarrollo de color por un método para medir la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas. Las concentraciones en el plasma de ratón se determinaron basándose en la absorbancia de la curva de referencia usando el software de análisis SOFTmax PRO (Molecular Devices). En la Fig. 42 se muestra una evolución temporal de las concentraciones de anticuerpos en el plasma después de la administración intravenosa, que se determinaron

por el método anterior. El resultado demuestra que, en ratones a los que se administraron las variantes resultantes de mejorar la unión a FcγR de 278-IgG1 con una fuerte actividad de unión a IgE humana dependiente del pH, la concentración de anticuerpos en el plasma de los ratones no se redujo significativamente en comparación con la de 278-IgG1.

5 (25-4) Determinación de la concentración plasmática de hIgE (Asp6) en ratones normales

Las concentraciones de hIgE (Asp6) en el plasma de ratón se midieron por el método ELISA. Se prepararon muestras de curva de calibración de 192, 96, 48, 24, 12, 6 y 3 ng/ml para concentraciones plasmáticas. Para asegurar la homogeneidad del inmunocomplejo entre la hIgE (Asp6) y el anticuerpo anti-hIgE, en el grupo al que se administró 278-hIgG1, se añadió Xolair (Novartis) en 10 µg/ml a las muestras de la curva de referencia y de ensayo de plasma de ratón, y las mezclas se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. En el grupo al que se administró 278-F1087, 278-F1022 (cadena pesada, SEQ ID NO: 76; cadena ligera, SEQ ID NO: 72; preparado de la misma manera que en el ejemplo 24) o 278-F760 (cadena pesada, SEQ ID NO: 77; cadena ligera, SEQ ID NO: 72; preparado de la misma manera que en el ejemplo A5) se añadió en 20 µg/ml, y las mezclas se agitaron a 37°C durante 60 horas. Las muestras de ensayo de plasma de ratón se repartieron en partes alícuotas en una inmunoplaqueta (MABTECH) con anti-IgE humana inmovilizada, o una inmunoplaqueta (Nunc F96 MicroWell Plate (Nalge nunc International)) con anti-IgE humana inmovilizada (clon 107, MABTECH), y esto se dejó reposar o se agitó a temperatura ambiente durante dos horas, o se dejó reposar a 4°C durante la noche. Después, la proteína nuclear GPC3 humana (SEQ ID NO: 78), el anticuerpo anti-GPC3 (preparación interna) biotinilado con NHS-PEG4-Biotina (Thermo Fisher Scientific) y estereptavidina-PoliHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) se hizo reaccionar cada uno sucesivamente durante una hora. La reacción cromogénica se llevó a cabo usando como sustrato TMB One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories). Después de terminar la reacción con ácido sulfúrico 1 N (Showa Chemical), las concentraciones en el plasma de ratón se determinaron basándose en el desarrollo de color por un método para medir la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas. Alternativamente, la reacción cromogénica se llevó a cabo usando un sustrato SuperSignal(r) ELISA Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific), y las concentraciones en el plasma de ratón se determinaron por un método para medir la intensidad de luminiscencia con un lector de microplacas. Las concentraciones en el plasma de ratón se determinaron basándose en la absorbancia o la intensidad de luminiscencia de la curva de referencia usando el software de análisis SOFTmax PRO (Molecular Devices). En la Fig. 43 se muestra una evolución temporal de las concentraciones de hIgE (Asp6) en el plasma después de la administración intravenosa, que se determinaron por el método anterior.

Con respecto a la eliminación de la IgE humana sola, el resultado demuestra que, en ratones a los que se administró IgE humana en combinación con 278-IgG1 que tienen una fuerte actividad de unión dependiente del pH, la eliminación de IgE humana se aceleró en comparación con la administración de IgE humana sola. Además, en ratones a los que se administró IgE humana en combinación con 278-F1087 que resulta de mejorar la unión a FcγR de 278-IgG1, se demostró que la eliminación de IgE humana se aceleraba significativamente en comparación con los ratones a los que se administró IgE humana sola, o IgE humana en combinación con 278-IgG1. Es decir, se demostró que la eliminación del antígeno se aceleraba no solo en ratones a los que se administró el anticuerpo anti-IL6R mencionado antes y el anticuerpo anti-IgA con unión a FcγR mejorada, sino también en ratones a los que se administró el anticuerpo anti-IgE con unión a FcγR mejorada. A partir de los resultados obtenidos hasta ahora en los ejemplos, la eliminación de antígeno en este caso también puede estar mediada principalmente por FcγRIIb.

Ejemplo 26. Efectos de eliminar antígenos del plasma para moléculas de unión al antígeno con actividad de unión a FcγRIIb mayor que la de una región Fc de IgG de ratón natural

(26-1) Efecto de la eliminación de antígeno de anticuerpos de ratón con actividad de unión a FcγRIIb selectivamente mejorada

En los ejemplos 5 a 7, se examinaron un grupo de ratones normales a los que se administró una molécula de unión al antígeno producida mejorando la actividad de unión a FcγR de ratón de una molécula de unión al antígeno que tiene una región Fc de anticuerpo de ratón y que tiene propiedades de unión al receptor de IL-6 humano dependiente del pH, y un grupo de ratones deficientes en la cadena γ y del receptor Fc y un grupo de ratones deficientes en FcγRIII que simula las condiciones en la que se administra un anticuerpo con actividad de unión a FcγRIIb de ratón mejorada selectivamente. A partir de estos resultados, se mostró que las moléculas de unión al antígeno que muestran una unión dependiente del pH a antígenos solubles y que tienen una actividad de unión a FcγRIIb mejorada selectivamente pueden eliminar eficazmente antígenos solubles en el plasma cuando se administran in vivo. Se examinó si este efecto se verá en ratones normales a los que se administró una molécula de unión al antígeno que comprende una región Fc de ratón con actividad de unión a FcγRIIb de ratón mejorada selectivamente y que tiene propiedades de unión al receptor de IL-6 humano dependientes del pH, como se indica a continuación.

55 (26-2) Producción de anticuerpos de ratón con actividad de unión FcγRIIb selectivamente mejorada

Se produjeron VH3-mIgG1 (SEQ ID NO: 49) y VL3-mk1 (SEQ ID NO: 50) como la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente, de un anticuerpo IgG1 de ratón que tiene propiedades de unión al receptor de IL-6 humano dependiente del pH usando el método del ejemplo de referencia 1. Además, para mejorar la actividad de unión a FcγRIIb del ratón de VH3-mIgG1, se llevaron a cabo las sustituciones de Thr por Glu en la posición 230, Val por Ala

en la posición 231, Pro por Asn en la posición 232, Ser por Glu en la posición 238 y Ser por Asp en la posición 239 indicado por la numeración EU para producir VH3-mIgG1-MB367 (SEQ ID NO: 79). Fv4-mIgG1 o Fv4-mIgG1-MB367 que comprenden VL3-mk1 como la cadena ligera y VH3-mIgG1 o VH3-mIgG1-MB367, respectivamente, como la cadena pesada, se expresaron y purificaron usando el método del ejemplo de referencia 1.

5 (26-3) Confirmación de la actividad de unión a FcγR de ratón

VH3/L (WT)-mIgG1 o VH3/L (WT)-mIgG1-MB367 que comprenden L (WT)-CK (SEQ ID NO: 42) como la cadena ligera y VH3-mIgG1 o VH3-mIgG1-MB367, respectivamente, como la cadena pesada, se expresaron y purificaron usando el método del ejemplo de referencia 1. Las actividades de unión a FcγR de ratón de estos anticuerpos se evaluaron por el método del ejemplo de referencia 2, y los resultados se muestran en la Tabla 31. Además, se muestra en la Tabla 32 cuánto mejora la actividad de unión a FcγR de ratón de cada variante en comparación con mIgG1 antes de la alteración.

Tabla 31

Nombre de variante	KD (M)	
	mFc γ RIIB	mFc γ RIII
VH3/L (WT)-mIgG1	2.10E-07	2.82E-07
VH3/L (WT)-mIgG1-MB367	1.32E-09	4.54E-08

Tabla 32

Nombre de variante	Relación de unión comparada con mIgG1	
	mFc γ RIIB	mFc γ RIII
VH3/L (WT)-mIgG1	1.0	1.0
VH3/L (WT)-mIgG1-MB367	158.6	6.2

De acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 32, VH3/L (WT)-mIgG1-MB367 producido introduciendo las cinco alteraciones mencionadas antes en VH3/L (WT)-mIgG1 tenía una actividad de unión a FcγRIIB de ratón que se mejoraba aproximadamente 160 veces y actividad de unión a FcγRIII de ratón que mejoraba 6.2 veces en comparación con antes de la alteración. Es decir, VH3/L (WT)-mIgG1-MB367 mostró actividad de unión a FcγRIIB de ratón selectiva y mejorada.

(26-4) Confirmación de los efectos de reducir la concentración de receptor de IL-6 humano soluble en el plasma usando ratones normales

Los efectos de la eliminación del receptor de IL-6 humano soluble en el plasma de ratones normales a los que se administró Fv4-mIgG1 o Fv4-mIgG1-MB367 como el anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano se examinaron como se describe a continuación.

(26-4-1) Ensayo in vivo con ratones normales

Se coadministraron a ratones normales (ratón C57BL/6J; Charles River Japan) el receptor de IL-6 humano soluble y el anticuerpo de ratón anti-receptor de IL-6 humano, y después se evaluó su dinámica in vivo. Se administró una solución mixta de receptor de IL-6 humano soluble y un anticuerpo de ratón anti-receptor de IL-6 humano una vez en una dosis de 10 ml/kg en la vena de la cola. En este caso, el receptor de IL-6 humano soluble y el anticuerpo de ratón anti-receptor de IL-6 humano se administraron en una dosis de 50 µg/kg y 1 mg/kg, respectivamente. El Fv4-mIgG1 o Fv4-mIgG1-MB367 mencionado antes se usó como un anticuerpo de ratón anti-receptor de IL-6 humano. Se recogió sangre de los ratones 5 minutos, 7 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 7 días, 14 días, 21 días y 28 días después de la administración del anticuerpo de ratón anti-receptor de IL-6 humano. Las muestras de sangre recogidas se centrifugaron inmediatamente a 4°C y 15 000 rpm durante 15 minutos para obtener el plasma. El plasma separado se almacenó en un congelador a -20°C o menos hasta la medición.

(26-4-2) Determinación por ELISA de la concentración de anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano en el plasma

La concentración de anticuerpo de ratón anti-receptor de IL-6 humano en el plasma de ratón se determinó por ELISA. Primero, el receptor de IL-6 humano soluble se repartió en partes alícuotas en una placa Nunc-Immuno Plate, MaxiSoup (Nalge nunc International) y se dejó reposar durante la noche a 4°C para preparar una placa con receptor de IL-6 humano soluble inmovilizado. Se prepararon muestras de la curva de calibración que contenían un anticuerpo de ratón anti-receptor de IL-6 humano en concentraciones plasmáticas de 2.50, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156, 0.078 y 0.039 µg/ml, y se prepararon muestras de ensayo de plasma de ratón diluidas 100 veces o más. Se repartieron en partes alícuotas 100 µl de estas muestras de la curva de calibración y muestras de ensayo de plasma en cada pocillo

de la placa con receptor de IL-6 humano soluble inmovilizado, y esto se agitó a temperatura ambiente durante dos horas. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción de desarrollo de color de una solución de reacción que se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante dos horas con el anticuerpo anti-IgG de ratón-peroxidasa (SIGMA) usando un sustrato de TMB One Component HRP Microwell Substrate (Laboratorios BioFX) como sustrato. Después de detener la reacción añadiendo ácido sulfúrico 1 N (Showa Chemical), se midió la absorbancia de la solución de reacción en cada pocillo a 450 nm mediante un lector de microplacas. La concentración de anticuerpos en el plasma de ratón se calculó basándose en la absorbancia de la curva de calibración usando el software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). Los resultados se muestran en la fig. 44.

(26-4-3) Determinación de la concentración de receptor de IL-6 humano soluble en el plasma por un método electroquimioluminiscente

Se determinó una concentración de hslL-6R en el plasma de ratón por un método electroquimioluminiscente. Las muestras de la curva de calibración de hslL-6R se prepararon en concentraciones plasmáticas de 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.781, 0.391 y 0.195 ng/ml. Las muestras de ensayo de plasma de ratón se prepararon por dilución 50 veces o superior. Anticuerpo monoclonal anti-IL-6R humano (R&D) que se ha marcado con rutenio usando SULFO-TAG NHS Ester (Meso Scale Discovery), anticuerpo anti-IL-6 R humano biotinilado (R&D) y solución de tocilizumab (Chugai Pharmaceutical Co. Ltd.) se mezclaron y se dejó reaccionar durante la noche a 37°C. Después, se bloqueó una placa de estreptavidina Gold Multi-ARRAY Plate (Meso Scale Discovery) con una solución de PBS-Tween que contenía BSA al 0.5% (p/v) a 5°C durante la noche, y la solución mezclada se repartió en partes alícuotas en la placa. Después de hacer reaccionar más la placa durante dos horas a temperatura ambiente, la placa se lavó. Después, el tampón de lectura T (x2) (Meso Scale Discovery) se repartió en partes alícuotas en la placa y las mediciones se llevaron a cabo inmediatamente usando SECTOR Imager 2400 (Meso Scale Discovery). Las concentraciones de hSIL-6R se calcularon basándose en la respuesta de la curva de calibración usando el software analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). Los resultados se muestran en la Fig. 45.

Como se muestra en la Fig. 44, en el grupo al que se administró Fv4-mlgG1-MB367 que tiene actividad de unión a FcγRIIb de ratón mejorada selectivamente, mientras que el cambio en la evolución temporal en la concentración de anticuerpos en el plasma era equivalente al del grupo al que se administró Fv4-mlgG1, no se observó disminución en la retención en el plasma de anticuerpo debido a la mejora de la actividad de unión a FcγRIIb de ratón. Por otro lado, como se muestra en la Fig. 45, en el grupo al que se administró Fv4-mlgG1-MB367 que tiene actividad de unión a FcγRIIb de ratón mejorada selectivamente, la concentración plasmática del receptor de IL-6 soluble disminuyó notablemente en comparación con la del grupo al que se administró Fv4-mlgG1.

Lo anterior mostraba que cuando se administra in vivo, una molécula de unión al antígeno que se une a un antígeno soluble de una manera dependiente del pH y tiene una actividad de unión a FcγRIIb selectivamente mejorada, puede eliminar eficazmente los antígenos solubles en el plasma en ratones normales también. Sin estar limitados por una teoría particular, los fenómenos observados aquí se pueden explicar de la siguiente manera.

Cuando se administra a un ratón un anticuerpo que se une a un antígeno soluble de manera dependiente del pH y tiene una actividad de unión a FcγRIIb mejorada, el anticuerpo es absorbido activamente principalmente por las células que expresan FcγRIIb en su membrana celular. El anticuerpo internalizado se disocia del antígeno soluble en las condiciones de pH ácido en el endosoma, y entonces es recirculado al plasma a través del FcRn. Por lo tanto, uno de los elementos que produce un efecto de eliminación de antígenos solubles en el plasma debido a dicho anticuerpo puede incluir la fuerza de la actividad de unión a FcγRIIb del anticuerpo. Es decir, una actividad de unión a FcγRIIb más fuerte conduce a una internalización más activa en las células que expresan FcγRIIb, y los antígenos solubles en el plasma se pueden eliminar rápidamente. Además, dichos efectos se pueden verificar de manera similar independientemente de si la región Fc incluida en el anticuerpo deriva de una IgG1 humana o una IgG1 de ratón, siempre que se mejore la actividad de unión a FcγRIIb. Más específicamente, la verificación se puede llevar a cabo usando la región Fc de cualquier especie animal, tal como IgG1 humana, IgG2 humana, IgG3 humana, IgG4 humana, IgG1 de ratón, IgG2a de ratón, IgG2b de ratón, IgG3 de ratón, IgG de rata, IgG de mono, o IgG de conejo siempre que la actividad de unión se mejore para FcγRIIb de la especie animal a la que se administra.

Ejemplo de referencia 1. Construcción de vectores de expresión de anticuerpos; y expresión y purificación de anticuerpos

La síntesis de genes de longitud completa que codifican las secuencias de nucleótidos de la cadena H y la cadena L de las regiones variables del anticuerpo se llevó a cabo por métodos de producción conocidos por los expertos en la técnica usando Assemble PCR y similares. La introducción de sustituciones de aminoácidos se llevó a cabo por métodos conocidos por los expertos en la técnica usando PCR o similares. El fragmento de plásmido obtenido se insertó en un vector de expresión de células animales, y se produjeron el vector de expresión de la cadena H y el vector de expresión de la cadena L. La secuencia de nucleótidos del vector de expresión obtenido se determinó por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los plásmidos producidos se introdujeron transitoriamente en la línea celular HEK293H derivada de células de cáncer de riñón embrionario humano (Invitrogen) o en células FreeStyle293 (Invitrogen) para la expresión de anticuerpos. Se recogió el líquido sobrenadante de cultivo obtenido y después se pasó a través de un filtro MILLEX(R)-GV de 0.22 μm (Millipore), o a través de un filtro MILLEX(R)-GV de 0.45 μm (Millipore) para obtener el líquido sobrenadante de cultivo. Los anticuerpos se purificaron del líquido

sobrenadante de cultivo obtenido por métodos conocidos por los expertos en la técnica usando rProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) o Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare). Para la concentración de los anticuerpos purificados, se midió su absorbancia a 280 nm usando un espectrofotómetro. A partir del valor obtenido, se usó el coeficiente de extinción calculado por métodos tales como PACE para calcular la concentración de anticuerpos (*Protein Science* 1995; 4: 2411-2423).

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

Los dominios extracelulares de FcγR se prepararon por el siguiente método. Primero, se sintetizó un gen del dominio extracelular de FcγR por un método bien conocido por los expertos en la técnica. En ese momento, la secuencia de cada FcγR se produjo basándose en la información registrada en el NCBI. Específicamente, FcγRI se produjo basándose en la secuencia del NCBI de nº de acceso NM_000566 (Versión Nº NM_000566.3), FcγRIIa se produjo basándose en la secuencia del NCBI de nº de acceso NM_001136219 (Versión Nº NM_001136219.1), FcγRIIb se produjo basándose en la secuencia del NCBI de nº de acceso NM_004001 (versión Nº NM_004001.3), FcγRIIIa se produjo basándose en la secuencia del NCBI de nº de acceso NM_001127593 (versión Nº NM_001127593.1), y FcγRIIIb se produjo basándose en la secuencia del NCBI de nº de acceso NM_000570 (Versión Nº NM_000570.3), y se unió un marcador de His en el extremo C. Además, se conoce la existencia de polimorfismo para FcγRIIa, FcγRIIIa y FcγRIIIb, y los sitios polimórficos se produjeron por referencia a Warmerdam et al. (*J. Exp. Med.*, 1990, 172: 19-25) para FcγRIIa; Wu et al. (*J. Clin. Invest.*, 1997, 100 (5): 1059-1070) para FcγRIIIa; y Ory et al. (*J. Clin. Invest.*, 1989, 84, 1688-1691) para FcγRIIIb.

Los fragmentos de genes obtenidos se insertaron en un vector de expresión de células animales y se produjeron vectores de expresión. Los vectores de expresión producidos se introdujeron transitoriamente en células FreeStyle293 derivadas de la línea celular de cáncer de riñón embrionario humano (Invitrogen) para expresar las proteínas de interés. Con respecto a FcγRIIb usado para el análisis cristalográfico, la proteína de interés se expresó en presencia de Kifunesina en una concentración final de 10 µg/ml, de modo que la cadena de azúcar añadida a FcγRIIb será de tipo con alto contenido en manosa. Las células se cultivaron, y después de recoger el líquido sobrenadante de cultivo obtenido, este se pasó a través de un filtro de 0.22 µm para obtener el líquido sobrenadante de cultivo. En principio, los líquidos sobrenadantes de cultivo obtenidos se purificaron en las siguientes cuatro etapas. Las etapas llevadas a cabo eran: cromatografía en columna de intercambio catiónico (SP Sepharose FF) en la etapa 1, cromatografía en columna de afinidad (HisTrap HP) para el marcador His en la etapa 2, cromatografía en columna de filtración en gel (Superdex200) en la etapa 3 y cromatografía aséptica en la etapa 4. Sin embargo, para FcγRI, se llevó a cabo cromatografía en columna de intercambio aniónico usando Q sepharose FF como etapa 1. Las proteínas purificadas se sometieron a mediciones de absorbancia a 280 nm usando un espectrofotómetro; y a partir de los valores obtenidos, se calcularon las concentraciones de las proteínas purificadas usando el coeficiente de absorción calculado usando métodos tales como PACE (*Protein Science* 1995; 4: 2411-2423).

El análisis de la interacción entre cada anticuerpo alterado y el receptor Fcγ preparado como se ha mencionado antes se llevó a cabo usando Biacore T100 (GE Healthcare), Biacore T200 (GE Healthcare), Biacore A100 y Biacore 4000. Se usó HBS-EP+ (GE Healthcare) como el tampón de análisis, y la temperatura de medición se ajustó a 25°C. Chips producidos por inmovilización del péptido antigénico, la proteína A (Thermo Scientific), proteína A/G (Thermo Scientific) y proteína L (ACTIGEN o BioVision) por el método de acoplamiento de amina a un chip de sensor CM5 Serie S (GE Healthcare) o Chip sensor CM4 Serie S (GE Healthcare), o alternativamente, se usaron chips producidos al permitir que péptidos antigénicos preliminarmente biotinilados interaccionen con y sean inmovilizados sobre un chip Sensor SA Serie S (certificado) (GE Healthcare).

Después de capturar los anticuerpos de interés en estos chips sensores, se permitió que interaccionara un receptor de Fcγ diluido con el tampón de análisis, se midió la cantidad unida a un anticuerpo y se compararon los anticuerpos. Sin embargo, puesto que la cantidad de receptor de Fcγ unido depende de la cantidad de anticuerpos capturados, la cantidad de receptor de Fcγ unido se dividió entre la cantidad de cada anticuerpo capturado para obtener valores corregidos, y estos valores se compararon. Además, los anticuerpos capturados en los chips se lavaron por reacción con glicina-HCl 10 mM, pH 1.5, y los chips se regeneraron y usaron repetidamente.

Los análisis cinéticos para calcular los valores de KD de cada anticuerpo alterado para FcγR se llevaron a cabo de acuerdo con el siguiente método. Primero, los anticuerpos de interés se capturaron sobre los chips sensores mencionados antes, y se permitió que interaccionara un receptor de Fcγ diluido con el tampón de análisis. Se usó el software de evaluación Biacore para ajustar globalmente los resultados medidos al sensorgrama obtenido usando el modelo de unión Langmuir de 1:1, y se calcularon la constante de velocidad de asociación k_a (l/mol/s) y la constante de velocidad de disociación k_d (1/s); y a partir de esos valores se calcularon las constantes de disociación KD (mol/l).

Cuando la interacción entre cada uno de los anticuerpos alterados y FcγR era débil, y el análisis cinético mencionado antes determinó que el análisis correcto era imposible, se calculó la KD para dichas interacciones usando la siguiente ecuación de modelo de unión 1:1 descrita en Biacore T100 Software Handbook BR1006-48 Edition AE.

El comportamiento de las moléculas que interaccionan de acuerdo con el modelo de unión 1:1 en Biacore se puede describir mediante la Ecuación 3 que se muestra a continuación.

Ecuación 3

$$R_{eq} = C \bullet R_{m\acute{a}x} / (KD + C) + RI$$

Req: una gráfica de los niveles de unión en estado estacionario frente a la concentración de analito

C: concentración

5 RI: contribución del índice de refracción en masa en la muestra

Rmáx: capacidad de unión al analito de la superficie

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

Ecuación 2

$$KD = C \bullet R_{m\acute{a}x} / (R_{eq} - RI) - C$$

- 10 KD se puede calcular sustituyendo los valores de Rmáx, RI y C en esta ecuación. Los valores de RI y C se pueden determinar a partir del sensorgrama de los resultados de medición y las condiciones de medición. Rmáx se calculó de acuerdo con el siguiente método. Como objetivo de comparación, para los anticuerpos que tenían interacciones suficientemente fuertes evaluadas simultáneamente en la misma ronda de medición, el valor Rmáx se obtuvo a través del ajuste global usando el modelo de unión de Langmuir 1:1, y después se dividió entre la cantidad de anticuerpo de comparación capturado sobre el chip sensor y multiplicado por la cantidad capturada de un anticuerpo alterado para ser evaluado.
- 15

Listado de secuencias

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

- 20 <120> Una molécula de unión al antígeno que promueve la desaparición de antígenos en plasma sanguíneo a través del contacto con Fc gamma RIIB

<130> C102Y1PY1P

<150> PCT/JP2012/054624

<151> 2012-02-24

- 25 <150> JP 2012-185866

<151> 2012-08-24

<150> PCT/JP2012/075092

<151> 2012-09-28

<160> 81

<170> PatentIn version 3.5

- 30 <210> 1

<211> 468

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 795 419 T3

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

ES 2 795 419 T3

Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp
 145 150 155 160
 Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys
 165 170 175
 Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met
 180 185 190
 Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe
 195 200 205
 Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val
 210 215 220
 Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp
 225 230 235 240
 Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg
 245 250 255
 Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp
 260 265 270
 Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His
 275 280 285
 Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser
 290 295 300
 Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser
 305 310 315 320
 Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr
 325 330 335
 Asn Lys Asp Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala Asn Ala Thr
 340 345 350
 Ser Leu Pro Val Gln Asp Ser Ser Ser Val Pro Leu Pro Thr Phe Leu
 355 360 365
 Val Ala Gly Gly Ser Leu Ala Phe Gly Thr Leu Leu Cys Ile Ala Ile
 370 375 380
 Val Leu Arg Phe Lys Lys Thr Trp Lys Leu Arg Ala Leu Lys Glu Gly

ES 2 795 419 T3

[illegible]

<210> 2
<211> 1407
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2							
atgctggccg	tcggtctgcgc	gctgctggct	gccctgctgg	ccgcgccggg	agcggcgctg		60
gccccaaaggc	gctgccctgc	gcaggaggtg	gcgagaggcg	tgctgaccag	tctgccagga		120
gacagcgtga	ctctgacctg	cccgggggta	gagccggaag	acaatgccac	tgttcactgg		180
gtgctcagga	agccggctgc	aggctcccac	cccagcagat	gggctggcat	gggaaggagg		240
ctgctgctga	ggtcggtgca	gctccacgac	tctggaaact	attcatgcta	ccgggccggc		300
cgcccagctg	ggactgtgca	cttgctggtg	gatgttcccc	ccgaggagcc	ccagctctcc		360
tgcttccgga	agagccccct	cagcaatgtt	gtttgtgagt	ggggtcctcg	gagcacccca		420
tccctgacga	caaaggctgt	gctcttggtg	aggaagtttc	agaacagtcc	ggccaagac		480
ttccaggagc	cgtgccagta	ttcccaggag	tcccagaagt	tctcctgcc	gttagcagtc		540
ccggagggag	acagctcttt	ctacatagt	tccatgtgcg	tcgccagtag	tgtcggggagc		600
aagttcagca	aaactcaaac	ctttcaggg	tgtggaatct	tcgagcctga	tccgcctgcc		660
aacatcacag	tactgccgt	ggccagaaac	ccccgctggc	tcagtgtcac	ctggcaagac		720
ccccactcct	ggaactcatc	tttctacaga	ctacggtttg	agctcagata	tcgggctgaa		780
cggtaaaga	cattcacaac	atggatggtc	aaggacctcc	agcatcactg	tgatcatccac		840
gacgcctgga	gcggcctgag	gcacgtggtg	cagcttcgtg	cccaggagga	gttcggggcaa		900
ggcgagtgga	gcgagtggag	cccgagggcc	atgggcacgc	cttgacaga	atccaggagt		960
cctccagctg	agaacgaggt	gtccaccccc	atgcaggcac	ttactactaa	taaagacgat		1020

ES 2 795 419 T3

gataatattc tcttcagaga ttctgcaaat ggcacaagcc tcccagtgca agattcttct 1080
 tcagtaccac tgcccacatt cctgggttgct ggagggagcc tggccttcgg aacgctcctc 1140
 tgcattgcca ttgttctgag gttcaagaag acgtggaagc tgcgggctct gaaggaaggc 1200
 aagacaagca tgcattccgc gtactctttg gggcagctgg tcccggagag gcctcgaccc 1260
 accccagtgcc ttgttctctc catctcccca ccggtgtccc ccagcagcct ggggtctgac 1320
 aatacctcga gccacaaccg accagatgcc agggaccac ggagccctta tgacatcagc 1380
 aatacagact acttcttccc cagatag 1407

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 4

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

15

Val His Ser

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 5

ES 2 795 419 T3

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15

Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
20 25 30

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

Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Ser Pro Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 6

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 Ser 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

10

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 7

ES 2 795 419 T3

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

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

Asn Gly Asp Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Met Gln Val
85 90 95

Leu Arg Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Gln
100 105 110

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 8

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

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

10 <210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Una secuencia sintetizada artificialmente

ES 2 795 419 T3

<400> 9

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

Gly Thr Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Pro Pro Thr Leu Leu Phe Ser Trp Ala Ser Ile Arg Asp Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Asp Leu Gln Ala Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Arg Ala Pro Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys
100 105 110

5 <210> 10
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 10

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 Ser Tyr
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val 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 Asp Asp Pro Gly Gly Gly Glu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15 <210> 11
<211> 126
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

ES 2 795 419 T3

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 11

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

5

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp 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 Arg Asp Ala Pro Tyr Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Ala
100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 12

<211> 365

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 12

Met Gly Val Pro Arg Pro Gln Pro Trp Ala Leu Gly Leu Leu Leu Phe
1 5 10 15

Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr
20 25 30

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

Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu
50 55 60

Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val
65 70 75 80

Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys
85 90 95

Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr
100 105 110

Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val

ES 2 795 419 T3

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

<210> 13
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13

ES 2 795 419 T3

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser
1 5 10 15

Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg
20 25 30

His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser
35 40 45

Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu
50 55 60

Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp
65 70 75 80

Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp
85 90 95

Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile
100 105 110

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met
115

<210> 14

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 14

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

10

ES 2 795 419 T3

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 15

<211> 326

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 795 419 T3

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 795 419 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 16

<211> 377

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 16

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

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

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

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

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

ES 2 795 419 T3

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

ES 2 795 419 T3

325

330

335

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 17

<211> 327

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 795 419 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 18

<211> 1125

<212> DNA

<213> Homo sapiens

5

<400> 18

atgtggttct tgacaactct gtccttttgg gttccagttg atgggcaagt ggacaccaca 60

aaggcagtga tcactttgca gcctccatgg gtcagcgtgt tccaagagga aaccgtaacc 120

ttgcactgtg aggtgctcca tctgcctggg agcagctcta cacagtgggt tctcaatggc 180

acagccactc agacctcgac cccagctac agaatacct ctgccagtgt caatgacagt 240

ggtgaatata ggtgccagag aggtctctca gggcgaagtg accccataca gctggaaatc 300

cacagaggct ggctactact gcaggtctcc agcagagtct tcacggaagg agaactctg 360

ES 2 795 419 T3

```
gccttgaggt gtcacgcgtg gaaggataag ctgggtgtaca atgtgcttta ctatcgaat 420
ggcaaagcct ttaagttttt ccaactggaat tctaacctca ccattctgaa aaccaacata 480
agtcacaatg gcacctacca ttgctcaggc atgggaaagc atcgctacac atcagcagga 540
atatctgtca ctgtgaaaga gctatttcca gctccagtgc tgaatgcatc tgtgacatcc 600
ccactcctgg aggggaatct ggtcaccctg agctgtgaaa caaagttgct cttgcagagg 660
cctggtttgc agctttactt ctccctctac atgggcagca agaccctgcg aggcaggaac 720
acatcctctg aataccaaat actaactgct agaagagaag actctgggtt atactggtgc 780
gaggctgcca cagaggatgg aaatgtcctt aagcgcagcc ctgagttgga gcttcaagtg 840
cttgccctcc agttaccaac tctgtctggt tttcatgtcc ttttctatct ggagtgaggga 900
ataatgtttt tagtgaacac tgttctctgg gtgacaatac gtaaagaact gaaaagaag 960
aaaaagtggg atttagaaat ctctttggat tctggtcatg agaagaaggt aatttccagc 1020
cttcaagaag acagacattt agaagaagag ctgaaatgtc aggaacaaaa agaagaacag 1080
ctgcaggaag ggtgacaccg gaaggagccc cagggggcca cgtag 1125
```

<210> 19

<211> 374

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 19

```
Met Trp Phe Leu Thr Thr Leu Leu Leu Trp Val Pro Val Asp Gly Gln
1 5 10 15
```

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

```
Val Phe Gln Glu Glu Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val Leu His Leu
35 40 45
```

```
Pro Gly Ser Ser Ser Thr Gln Trp Phe Leu Asn Gly Thr Ala Thr Gln
50 55 60
```

```
Thr Ser Thr Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Ser Ala Ser Val Asn Asp Ser
65 70 75 80
```

```
Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Arg Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Pro Ile
85 90 95
```

```
Gln Leu Glu Ile His Arg Gly Trp Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Arg
100 105 110
```

ES 2 795 419 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Pro Gln Gly Ala Thr
370

<210> 20

<211> 951

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

ES 2 795 419 T3

```

atgactatgg agacccaaat gtctcagaat gtatgtccca gaaacctgtg gctgcttcaa      60
ccattgacag ttttgctgct gctggcttct gcagacagtc aagctgctcc cccaaaggct      120
gtgctgaaac ttgagccccc gtggatcaac gtgctccagg aggactctgt gactctgaca      180
tgccaggggg ctgcgagccc tgagagcgac tccattcagt ggttccacaa tgggaatctc      240
attcccaccc acacgcagcc cagctacagg ttcaaggcca acaacaatga cagcggggag      300
tacacgtgcc agactggcca gaccagcctc agcgaccctg tgcactctgac tgtgctttcc      360
gaatggctgg tgctccagac ccttcacctg gagttccagg agggagaaaac catcatgctg      420
aggtgccaca gctggaagga caagcctctg gtcaagggtca cattcttcca gaatggaaaa      480
tcccagaaat tctcccatth ggatcccacc ttctccatcc cacaagcaaa ccacagtcac      540
agtgggtgatt accactgcac aggaacata ggctacacgc tgttctcatc caagcctgtg      600
accatcactg tccaagtgcc cagcatgggc agctcttcac caatgggggt cattgtggct      660
gtggtcattg cgactgctgt agcagccatt gttgctgctg tagtggcctt gatctactgc      720
aggaaaaagc ggatttcagc caattccact gatcctgtga aggctgcca atttgagcca      780
cctggacgtc aaatgattgc catcagaaag agacaacttg aagaaaccaa caatgactat      840
gaaacagctg acggcgggcta catgactctg aaccccaggg cacctactga cgatgataaa      900
aacatctacc tgactcttcc tccaacgac catgtcaaca gtaataacta a                951

```

<210> 21

<211> 316

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 21

```

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

```

```

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

```

```

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

```

ES 2 795 419 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 22

<211> 876

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

ES 2 795 419 T3

```

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

```

<210> 23

<211> 291

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 23

```

Met Gly Ile Leu Ser Phe Leu Pro Val Leu Ala Thr Glu Ser Asp Trp
1           5           10           15

```

```

Ala Asp Cys Lys Ser Pro Gln Pro Trp Gly His Met Leu Leu Trp Thr
          20           25           30

```

```

Ala Val Leu Phe Leu Ala Pro Val Ala Gly Thr Pro Ala Ala Pro Pro
          35           40           45

```

```

Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu
50           55           60

```

ES 2 795 419 T3

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

<210> 24

<211> 765

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 24

ES 2 795 419 T3

```

atgtggcagc tgctcctccc aactgctctg ctacttctag tttcagctgg catgcggact      60
gaagatctcc caaaggctgt ggtgttcctg gagcctcaat ggtacagggg gctcgagaag      120
gacagtgtga ctctgaagtg ccaggggagcc tactcccctg aggacaattc cacacagtgg      180
tttcacaatg agagcctcat ctcaagccag gcctcgagct acttcattga cgctgccaca      240
gttgacgaca gtggagagta cagggtgccag acaaacctct ccaccctcag tgacccgggtg      300
cagctagaag tccatatcgg ctggctgttg ctccaggccc ctcggtgggt gttcaaggag      360
gaagacccta ttcacctgag gtgtcacagc tggaagaaca ctgctctgca taaggtcaca      420
tatttacaga atggcaaagg caggaagtat tttcatcata attctgactt ctacattcca      480
aaagccacac tcaaagacag cggctcctac ttctgcaggg ggcttggttg gagtaaaat      540
gtgtcttcag agactgtgaa catcaccatc actcaagggt tgtcagtgtc aaccatctca      600
tcattctttc cacctgggta ccaagtctct ttctgcttgg tgatggtact cttttttgca      660
gtggacacag gactatattt ctctgtgaag acaaacattc gaagctcaac aagagactgg      720
aaggaccata aatttaaagt gagaaaggac cctcaagaca aatga                        765

```

<210> 25

<211> 254

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 25

```

Met Trp Gln Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Val Ser Ala
1          5          10          15

```

```

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
          20          25          30

```

```

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
          35          40          45

```

```

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
          50          55          60

```

```

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
65          70          75          80

```

```

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

```

ES 2 795 419 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 26

<211> 702

<212> DNA

5 <213> Homo sapiens

<400> 26

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

10 <210> 27

<211> 233

ES 2 795 419 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27
Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Val Ser Ala
1 5 10 15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
20 25 30

Gln Trp Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
35 40 45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
50 55 60

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile
225 230

<210> 28
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

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

Gly Gly Gly Ser
 1
 <210> 29
 <211> 4
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Una secuencia sintetizada artificialmente
 <400> 29
 Ser Gly Gly Gly
 1
 10 <210> 30
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Una secuencia sintetizada artificialmente
 <400> 30
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 31
 <211> 5
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Una secuencia sintetizada artificialmente
 <400> 31
 Ser Gly Gly Gly Gly
 25 1 5
 <210> 32
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Una secuencia sintetizada artificialmente
 <400> 32
 Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 33
 <211> 6
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Una secuencia sintetizada artificialmente
 <400> 33
 Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 40 1 5
 <210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 34
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5
 <210> 35
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Una secuencia sintetizada artificialmente
 <400> 35
 Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 10 1 5
 <210> 36
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Una secuencia sintetizada artificialmente
 <400> 36

ES 2 795 419 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 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

ES 2 795 419 T3

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 37

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 37

ES 2 795 419 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 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> 38

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 38

ES 2 795 419 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 His Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

ES 2 795 419 T3

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 39

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 39

ES 2 795 419 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 Thr Asp Ile Ser Ser His
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 40

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 40

ES 2 795 419 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 His Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

ES 2 795 419 T3

225		230		235		240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser						
		245		250		255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp						
		260		265		270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn						
		275		280		285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val						
		290		295		300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu						
		305		310		315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Asp Ala Tyr Pro Ala Pro Ile Glu Lys						
		325		330		335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr						
		340		345		350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr						
		355		360		365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu						
		370		375		380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu						
		385		390		395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys						
		405		410		415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu						
		420		425		430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro						
		435		440		445

<210> 41

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 41

ES 2 795 419 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 His Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Arg Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Lys Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

ES 2 795 419 T3

	245		250		255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp	260		265		270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn	275		280		285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val	290		295		300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu	305		310		315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys	325		330		335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr	340		345		350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr	355		360		365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu	370		375		380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu	385		390		395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys	405		410		415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu	420		425		430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro	435		440		445

<210> 42

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 42

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

10

ES 2 795 419 T3

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

<210> 43

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 43

ES 2 795 419 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 His Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

ES 2 795 419 T3

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Asp Ala Tyr Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu
420 425 430

Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 44

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 44

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

10

ES 2 795 419 T3

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	His	Ser	Ile	Ser	His	Asp	20	25	30	
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Glu	Trp	35	40	45	
Ile	Gly	Phe	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	50	55	60	
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Glu	Gly	100	105	110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220	
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	225	230	235	240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	245	250	255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	260	265	270	

ES 2 795 419 T3

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Tyr Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 45

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 45

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

10

ES 2 795 419 T3

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

ES 2 795 419 T3

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 46

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 46

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

10

ES 2 795 419 T3

Ile	Gly	Phe	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	50	55	60	
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Glu	Gly	100	105	110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220	
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	225	230	235	240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	245	250	255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	260	265	270	
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	275	280	285	
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	290	295	300	

ES 2 795 419 T3

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Tyr Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu
420 425 430

Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 47

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 47

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

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

10

ES 2 795 419 T3

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

ES 2 795 419 T3

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu
420 425 430

Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 48

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 48

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

10

ES 2 795 419 T3

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

ES 2 795 419 T3

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Ala His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 49

<211> 443

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 49

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

ES 2 795 419 T3

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

ES 2 795 419 T3

355 360 365
 Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala
 370 375 380
 Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr
 385 390 395 400
 Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly
 405 410 415
 Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His
 420 425 430
 Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440
 <210> 50
 <211> 214
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus
 <400> 50
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110
 Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
 115 120 125
 Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile

ES 2 795 419 T3

130

135

140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210

<210> 51

<211> 443

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 51

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr
115 120 125

10

ES 2 795 419 T3

Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
 195 200 205

Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys
 210 215 220

Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro
 225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser
 260 265 270

Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg
 275 280 285

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile
 290 295 300

Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn
 305 310 315 320

Ser Ala Asp Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
 325 330 335

Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu
 340 345 350

Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe
 355 360 365

Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala

ES 2 795 419 T3

370

375

380

Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr
385 390 395 400

Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly
405 410 415

Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His
420 425 430

Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 52

<211> 443

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 52

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu
130 135 140

10

ES 2 795 419 T3

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
 195 200 205
 Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys
 210 215 220
 Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Asp Val Phe Ile Phe Pro
 225 230 235 240
 Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr
 245 250 255
 Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser
 260 265 270
 Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg
 275 280 285
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile
 290 295 300
 Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn
 305 310 315 320
 Ser Ala Asp Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
 325 330 335
 Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu
 340 345 350
 Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe
 355 360 365
 Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala
 370 375 380
 Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr

ES 2 795 419 T3

385 390 395 400

Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly
405 410 415

Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His
420 425 430

Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 53

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 53

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 54

<211> 447

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 54

ES 2 795 419 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 His Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

ES 2 795 419 T3

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 55

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 55

ES 2 795 419 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 His Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30
 His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

ES 2 795 419 T3

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 56

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 56

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

ES 2 795 419 T3

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 57

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 57

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

10

ES 2 795 419 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Val Ala Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Phe Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

ES 2 795 419 T3

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro

<210> 58

<211> 218

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 58

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

10

ES 2 795 419 T3

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

<210> 59

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 59

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

10

ES 2 795 419 T3

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

ES 2 795 419 T3

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro

<210> 60

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 60

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

10

ES 2 795 419 T3

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

ES 2 795 419 T3

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Tyr His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 61

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 61

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp

10

ES 2 795 419 T3

20										25					30															
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Glu	Trp															
		35					40					45																		
Ile	Gly	Phe	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu															
	50					55					60																			
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr															
65					70				75						80															
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys															
				85					90					95																
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Glu	Gly															
			100					105					110																	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe															
		115					120					125																		
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu															
	130					135					140																			
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp															
145					150					155					160															
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu															
				165					170					175																
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser															
			180					185						190																
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro															
		195					200					205																		
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys															
	210					215					220																			
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Asp															
225					230					235					240															
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	Ser															
				245					250					255																
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp															
			260					265						270																

ES 2 795 419 T3

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Tyr His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 62

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 62

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp

10

ES 2 795 419 T3

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

ES 2 795 419 T3

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 63

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 63

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu

10

ES 2 795 419 T3

50						55										60
Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Glu	Gly	
			100					105					110			
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	
		115					120					125				
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	
	130					135					140					
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	
145					150					155					160	
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	
				165					170					175		
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	
			180					185					190			
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	
		195					200					205				
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	
	210					215					220					
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	
225					230					235					240	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	
				245					250					255		
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
			260					265					270			
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	
		275					280					285				
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	
	290					295					300					

ES 2 795 419 T3

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 64

<211> 444

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 64

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

10

ES 2 795 419 T3

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

ES 2 795 419 T3

Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
435 440

<210> 65

<211> 464

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 65

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

10

ES 2 795 419 T3

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

ES 2 795 419 T3

Thr Leu Ser Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu
340 345 350

Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu
370 375 380

Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser
385 390 395 400

Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile
405 410 415

Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys
420 425 430

Met Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile
435 440 445

Asp Arg Leu Ala Gly Lys Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
450 455 460

<210> 66

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 66

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

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

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

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

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

10

ES 2 795 419 T3

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

ES 2 795 419 T3

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro
450

<210> 67

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 67

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 Ser Ile Ser Asp Asp
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Ser Ser Pro Leu

10

ES 2 795 419 T3

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 68

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 68

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

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

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

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

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

10

ES 2 795 419 T3

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

ES 2 795 419 T3

325

330

335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro
450

<210> 69

<211> 543

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 69

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

10

ES 2 795 419 T3

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

ES 2 795 419 T3

			325				330				335				
Ser	Arg	Pro	Ser 340	Pro	Phe	Asp	Leu	Phe 345	Ile	Arg	Lys	Ser	Pro 350	Thr	Ile
Thr	Cys	Leu 355	Val	Val	Asp	Leu	Ala 360	Pro	Ser	Lys	Gly	Thr 365	Val	Asn	Leu
Thr	Trp 370	Ser	Arg	Ala	Ser	Gly 375	Lys	Pro	Val	Asn	His 380	Ser	Thr	Arg	Lys
Glu 385	Glu	Lys	Gln	Arg	Asn 390	Gly	Thr	Leu	Thr	Val 395	Thr	Ser	Thr	Leu	Pro 400
Val	Gly	Thr	Arg	Asp 405	Trp	Ile	Glu	Gly	Glu 410	Thr	Tyr	Gln	Cys	Arg 415	Val
Thr	His	Pro	His 420	Leu	Pro	Arg	Ala	Leu 425	Met	Arg	Ser	Thr	Thr 430	Lys	Thr
Ser	Gly	Pro 435	Arg	Ala	Ala	Pro	Glu 440	Val	Tyr	Ala	Phe	Ala 445	Thr	Pro	Glu
Trp	Pro 450	Gly	Ser	Arg	Asp	Lys 455	Arg	Thr	Leu	Ala	Cys 460	Leu	Ile	Gln	Asn
Phe 465	Met	Pro	Glu	Asp	Ile 470	Ser	Val	Gln	Trp	Leu 475	His	Asn	Glu	Val	Gln 480
Leu	Pro	Asp	Ala	Arg 485	His	Ser	Thr	Thr	Gln 490	Pro	Arg	Lys	Thr	Lys 495	Gly
Ser	Gly	Phe	Phe 500	Val	Phe	Ser	Arg	Leu 505	Glu	Val	Thr	Arg	Ala 510	Glu	Trp
Glu	Gln	Lys 515	Asp	Glu	Phe	Ile	Cys 520	Arg	Ala	Val	His	Glu 525	Ala	Ala	Ser
Pro	Ser 530	Gln	Thr	Val	Gln	Arg 535	Ala	Val	Ser	Val	Asn 540	Pro	Gly	Lys	

$\langle 210 \rangle$ 70

<211> 219

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

ES 2 795 419 T3

<400> 70

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> 71

<211> 443

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 71

ES 2 795 419 T3

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

ES 2 795 419 T3

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

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

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 72

<211> 217

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 72

ES 2 795 419 T3

Ala Tyr Asp Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
 1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Trp
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Glu Cys
 65 70 75 80

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

Ile Asp Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Arg Thr
 100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 180 185 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 73

<211> 32

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 73

Val Asp Asp Ala Pro Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn
 1 5 10 15

Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys
 20 25 30

10 <210> 74

ES 2 795 419 T3

<211> 443
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 74

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

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

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

Val Ile Asn Ser Ala Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60

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

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

Phe Ser Ser Gly Ser His Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly

ES 2 795 419 T3

165	170	175
Leu Tyr Ser 180	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser 185	Leu Gly 190
Thr Gln Thr 195	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys 200	205
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys 210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu 225	230	235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu 245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys 260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys 275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu 290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys 305	310	315 320
Val Ser Asn Lys Ala Tyr Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys 325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser 340	345	350
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys 355	360	365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln 370	375	380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly 385	390	395 400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln 405	410	415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn 420	425	430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro 435	440	

<210> 75

<211> 543

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 795 419 T3

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 75

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 Ala Ser Thr Gln Ser Pro Ser Val Phe Pro Leu Thr Arg
115 120 125

Cys Cys Lys Asn Ile Pro Ser Asp Ala Thr Ser Val Thr Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Ala Thr Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Met Val Thr Trp Asp Thr
145 150 155 160

Gly Ser Leu Asp Gly Thr Thr Met Thr Leu Pro Ala Thr Thr Leu Thr
165 170 175

Leu Ser Gly His Tyr Ala Thr Ile Ser Leu Leu Thr Val Ser Gly Ala

ES 2 795 419 T3

180	185	190
Trp Ala Lys Gln Met Phe Thr Cys Arg Val Ala His Thr Pro Ser Ser		
195	200	205
Thr Asp Trp Val Asp Asp Lys Thr Phe Ser Val Cys Ser Arg Asp Phe		
210	215	220
Thr Pro Pro Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly		
225	230	235
His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr		
245	250	255
Pro Gly Thr Ile Asp Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp		
260	265	270
Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser		
275	280	285
Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg		
290	295	300
Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser		
305	310	315
Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu		
325	330	335
Ser Arg Pro Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile		
340	345	350
Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asp Leu		
355	360	365
Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asp His Ser Thr Arg Lys		
370	375	380
Glu Glu Lys Gln Arg Asn Gly Thr Leu Thr Val Thr Ser Thr Leu Pro		
385	390	395
Val Gly Thr Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val		
405	410	415
Thr His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr		
420	425	430

ES 2 795 419 T3

Ser Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu
435 440 445

Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn
450 455 460

Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln
465 470 475 480

Leu Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly
485 490 495

Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp
500 505 510

Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser
515 520 525

Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys
530 535 540

<210> 76

<211> 443

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 76

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

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

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

Val Ile Asn Ser Ala Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

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

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

Phe Ser Ser Gly Ser His Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr

10

ES 2 795 419 T3

100	105	110
Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro		
115	120	125
Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val		
130	135	140
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala		
145	150	155
160		
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly		
165	170	175
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly		
180	185	190
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys		
195	200	205
Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys		
210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu		
225	230	235
240		
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu		
245	250	255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys		
260	265	270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys		
275	280	285
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		
290	295	300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys		
305	310	315
320		
Val Ser Asn Asp Ala Tyr Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys		
325	330	335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser		
340	345	350

ES 2 795 419 T3

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 77

<211> 443

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 77

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

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

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

Val Ile Asn Ser Ala Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

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

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

Phe Ser Ser Gly Ser His Asp Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

10

ES 2 795 419 T3

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

ES 2 795 419 T3

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

<210> 78

<211> 545

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 78

Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser
1 5 10 15

Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro
20 25 30

Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys
35 40 45

Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn
50 55 60

Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile
65 70 75 80

Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg
85 90 95

His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser
100 105 110

Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val
115 120 125

Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn
130 135 140

ES 2 795 419 T3

Glu	Leu	Phe	Asp	Ser	Leu	Phe	Pro	Val	Ile	Tyr	Thr	Gln	Leu	Met	Asn	
145					150					155					160	
Pro	Gly	Leu	Pro	Asp	Ser	Ala	Leu	Asp	Ile	Asn	Glu	Cys	Leu	Arg	Gly	
				165					170					175		
Ala	Arg	Arg	Asp	Leu	Lys	Val	Phe	Gly	Asn	Phe	Pro	Lys	Leu	Ile	Met	
			180					185					190			
Thr	Gln	Val	Ser	Lys	Ser	Leu	Gln	Val	Thr	Arg	Ile	Phe	Leu	Gln	Ala	
	195						200					205				
Leu	Asn	Leu	Gly	Ile	Glu	Val	Ile	Asn	Thr	Thr	Asp	His	Leu	Lys	Phe	
	210					215					220					
Ser	Lys	Asp	Cys	Gly	Arg	Met	Leu	Thr	Arg	Met	Trp	Tyr	Cys	Ser	Tyr	
225					230					235					240	
Cys	Gln	Gly	Leu	Met	Met	Val	Lys	Pro	Cys	Gly	Gly	Tyr	Cys	Asn	Val	
				245					250					255		
Val	Met	Gln	Gly	Cys	Met	Ala	Gly	Val	Val	Glu	Ile	Asp	Lys	Tyr	Trp	
		260						265					270			
Arg	Glu	Tyr	Ile	Leu	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Val	Asn	Gly	Met	Tyr	Arg	
		275					280					285				
Ile	Tyr	Asp	Met	Glu	Asn	Val	Leu	Leu	Gly	Leu	Phe	Ser	Thr	Ile	His	
	290					295					300					
Asp	Ser	Ile	Gln	Tyr	Val	Gln	Lys	Asn	Ala	Gly	Lys	Leu	Thr	Thr	Thr	
305					310					315					320	
Ile	Gly	Lys	Leu	Cys	Ala	His	Ser	Gln	Gln	Arg	Gln	Tyr	Arg	Ser	Ala	
				325					330					335		
Tyr	Tyr	Pro	Glu	Asp	Leu	Phe	Ile	Asp	Lys	Lys	Val	Leu	Lys	Val	Ala	
			340					345					350			
His	Val	Glu	His	Glu	Glu	Thr	Leu	Ser	Ser	Arg	Arg	Arg	Glu	Leu	Ile	
		355					360					365				
Gln	Lys	Leu	Lys	Ser	Phe	Ile	Ser	Phe	Tyr	Ser	Ala	Leu	Pro	Gly	Tyr	
	370					375					380					
Ile	Cys	Ser	His	Ser	Pro	Val	Ala	Glu	Asn	Asp	Thr	Leu	Cys	Trp	Asn	
385					390				395						400	

ES 2 795 419 T3

Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly
405 410 415

Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu
420 425 430

Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu
435 440 445

Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu
450 455 460

Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ala Gly Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu
465 470 475 480

Cys Ile Gly Gly Ala Gly Asp Gly Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu
485 490 495

Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro
500 505 510

Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe
515 520 525

His Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys His His His His His
530 535 540

His
545

<210> 79

<211> 433

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 79

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

10

ES 2 795 419 T3

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
 195 200 205
 Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys
 210 215 220
 Pro Cys Ile Cys Glu Ala Asn Glu Val Glu Asp Val Phe Ile Phe Pro
 225 230 235 240
 Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr
 245 250 255
 Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser
 260 265 270
 Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg
 275 280 285
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile
 290 295 300

ES 2 795 419 T3

Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn
305 310 315 320

Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
325 330 335

Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu
340 345 350

Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe
355 360 365

Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala
370 375 380

Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr
385 390 395 400

Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly
405 410 415

Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His
420 425 430

Thr

<210> 80

<211> 328

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

<400> 80

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

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

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

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

10

ES 2 795 419 T3

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

<210> 81

<211> 325

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Una secuencia sintetizada artificialmente

ES 2 795 419 T3

<400> 81

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

ES 2 795 419 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu
325

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión al antígeno para usar en un método de tratamiento por eliminación de antígeno del plasma, en donde la molécula de unión al antígeno comprende un dominio de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno varía dependiendo de las condiciones de la concentración de iones, y una región Fc en la que el aminoácido en la posición 238 es Asp y el aminoácido en la posición 271 es Gly indicado por la numeración EU caracterizada por tener una actividad de unión a FcγRIIB mejorada en comparación con la región Fc presentada como IgG1 (SEQ ID NO: 14), en donde el dominio de unión al antígeno es una región variable de anticuerpo, y en donde la región Fc es una región Fc de IgG1 humana, en donde la actividad de unión al antígeno de un dominio de unión al antígeno que cambia dependiendo de las condiciones de la concentración de iones se define por uno o ambos de los siguientes (a) y (b):
 - 5 (a) el valor de KD (Ca 3 μM)/KD (Ca 2 mM), que es la relación de la constante de disociación (KD) para un antígeno en unas condiciones de concentración de iones de calcio bajas a la KD en unas condiciones de concentración de iones de calcio altas, es 2 o más; y
 - (b) el valor de KD (pH5.8)/KD (pH7.4), que es la relación de KD para el antígeno en unas condiciones de intervalo de pH ácido a la KD en unas condiciones de intervalo de pH neutro, es 2 o más.
- 15 2. La molécula de unión al antígeno para usar según reivindicación 1, en donde la región Fc tiene una sustitución de aminoácido en al menos una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 233, 234, 237, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 272, 274, 296, 326, 327, 330, 331, 332, 333, 355, 356, 358, 396, 409 y 419 indicado por la numeración EU.
3. La molécula de unión al antígeno para usar según reivindicación 2, en donde los aminoácidos de la región Fc incluyen uno o más de los siguientes aminoácidos indicados por la numeración EU:
 - 20 Asp en la posición de aminoácido 233;
Tyr en la posición de aminoácido 234;
Asp en la posición de aminoácido 237;
Ile en la posición de aminoácido 264;
Glu en la posición de aminoácido 265;
 - 25 uno cualquiera de Phe, Met y Leu en la posición de aminoácido 266;
uno cualquiera de Ala, Glu, Gly y Gln en la posición de aminoácido 267;
uno cualquiera de Asp, Glu y Gln en la posición de aminoácido 268;
Asp en la posición de aminoácido 269;
uno cualquiera de Asp, Phe, Ile, Met, Asn, Pro y Gln en la posición de aminoácido 272;
 - 30 Gln en la posición de aminoácido 274;
Asp o Phe en la posición de aminoácido 296;
Ala o Asp en la posición de aminoácido 326;
Gly en la posición de aminoácido 327;
Lys o Arg en la posición de aminoácido 330;
 - 35 Ser en la posición de aminoácido 331;
Thr en la posición de aminoácido 332;
uno cualquiera de Thr, Lys y Arg en la posición de aminoácido 333;
Gln en la posición de aminoácido 355;
Glu en la posición de aminoácido 356;
 - 40 Met en la posición de aminoácido 358;
uno cualquiera de Asp, Glu, Phe, Ile, Lys, Leu, Met, Gln, Arg y Tyr en la posición de aminoácido 396;
Arg en la posición de aminoácido 409; y

Glu en la posición de aminoácido 419.

4. La molécula de unión al antígeno para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la región Fc es una región Fc en la que el aminoácido en la posición 238 es Asp y el aminoácido en la posición 271 es Gly indicado por la numeración EU en la región Fc incluida en la SEQ ID NO: 14.

5 5. La molécula de unión al antígeno para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la actividad de unión a FcRn de la región Fc en unas condiciones de intervalo de pH ácido se mejora en comparación con la actividad de unión a FcRn de la región Fc incluida en la SEQ ID NO: 14.

10 6. La molécula de unión al antígeno para usar según la reivindicación 5, en donde la región Fc con unión mejorada es una región Fc que tiene una sustitución de aminoácido al menos en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 244, 245, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 260, 262, 265, 270, 272, 279, 283, 285, 286, 288, 293, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 314, 316, 317, 318, 332, 339, 340, 341, 343, 356, 360, 362, 375, 376, 377, 378, 380, 382, 385, 386, 387, 388, 389, 400, 413, 415, 423, 424, 427, 428, 430, 431, 433, 434, 435, 436, 438, 439, 440, 442, y 447, indicado por la numeración EU, en la secuencia de aminoácidos de la región Fc incluida en la SEQ ID NO: 14.

15 7. La molécula de unión al antígeno para usar según la reivindicación 6, en donde la región Fc con unión mejorada comprende al menos uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en:

Leu en la posición de aminoácido 244;

Arg en la posición de aminoácido 245;

Pro en la posición de aminoácido 249;

20 Gln o Glu en la posición de aminoácido 250;

uno cualquiera de Arg, Asp, Glu y Leu en la posición de aminoácido 251;

uno cualquiera de Phe, Ser, Thr y Tyr en la posición de aminoácido 252;

Ser o Thr en la posición de aminoácido 254;

uno cualquiera de Arg, Gly, Ile y Leu en la posición de aminoácido 255;

25 uno cualquiera de Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Pro y Thr en la posición de aminoácido 256;

uno cualquiera de Ala, Ile, Met, Asn, Ser y Val en la posición de aminoácido 257;

Asp en la posición de aminoácido 258;

Ser en la posición de aminoácido 260;

Leu en la posición de aminoácido 262;

30 Lys en la posición de aminoácido 270;

Leu o Arg en la posición de aminoácido 272;

uno cualquiera de Ala, Asp, Gly, His, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp y Tyr en la posición de aminoácido 279;

uno cualquiera de Ala, Asp, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Trp y Tyr en la posición de aminoácido 283;

35 Asn en la posición de aminoácido 285;

Phe en la posición de aminoácido 286;

Asn o Pro en la posición de aminoácido 288;

Val en la posición de aminoácido 293;

uno cualquiera de Ala, Glu, Gln y Met en la posición de aminoácido 307;

40 uno cualquiera de Ile, Pro y Thr en la posición de aminoácido 308;

Pro en la posición de aminoácido 309;

uno cualquiera de Ala, Glu, Ile, Lys, Leu, Met, Ser, Val y Trp en la posición de aminoácido 311;

- uno cualquiera de Ala, Asp y Pro en la posición de aminoácido 312;
 Ala o Leu en la posición de aminoácido 314;
 Lys en la posición de aminoácido 316;
 Pro en la posición de aminoácido 317;
- 5 Asn o Thr en la posición de aminoácido 318;
 uno cualquiera de Phe, His, Lys, Leu, Met, Arg, Ser y Trp en la posición de aminoácido 332;
 uno cualquiera de Asn, Thr y Trp en la posición de aminoácido 339;
 Pro en la posición de aminoácido 341;
 uno cualquiera de Glu, His, Lys, Gln, Arg, Thr y Tyr en la posición de aminoácido 343;
- 10 Arg en la posición de aminoácido 375;
 uno cualquiera de Gly, Ile, Met, Pro, Thr y Val en la posición de aminoácido 376;
 Lys en la posición de aminoácido 377;
 uno cualquiera de Asp, Asn y Val en la posición de aminoácido 378;
 uno cualquiera de Ala, Asn, Ser y Thr en la posición de aminoácido 380;
- 15 uno cualquiera de Phe, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp y Tyr en la posición de aminoácido 382;
 uno cualquiera de Ala, Arg, Asp, Gly, His, Lys, Ser y Thr en la posición de aminoácido 385;
 uno cualquiera de Arg, Asp, Ile, Lys, Met, Pro, Ser y Thr en la posición de aminoácido 386;
 uno cualquiera de Ala, Arg, His, Pro, Ser y Thr en la posición de aminoácido 387;
- 20 uno cualquiera de Asn, Pro y Ser en la posición de aminoácido 389;
 Asn en la posición de aminoácido 423;
 Asn en la posición de aminoácido 427;
 uno cualquiera de Leu, Met, Phe, Ser y Thr en la posición de aminoácido 428;
 uno cualquiera de Ala, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr, Val y Tyr en la posición de aminoácido 430;
- 25 His o Asn en la posición de aminoácido 431;
 uno cualquiera de Arg, Gln, His, Ile, Lys, Pro y Ser en la posición de aminoácido 433;
 uno cualquiera de Ala, Gly, His, Phe, Ser, Trp y Tyr en la posición de aminoácido 434;
 uno cualquiera de Arg, Asn, His, Ile, Leu, Lys, Met y Thr en la posición de aminoácido 436;
 uno cualquiera de Lys, Leu, Thr y Trp en la posición de aminoácido 438;
- 30 Lys en la posición de aminoácido 440; y
 Lys en la posición de aminoácido 442
- indicado por la numeración EU, en la secuencia de aminoácidos de la región Fc incluida en la SEQ ID NO: 14.
8. La molécula de unión al antígeno para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo.
- 35 9. La molécula de unión al antígeno para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque se trata un cáncer o una enfermedad antiinflamatoria.
10. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión al antígeno como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para usar según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

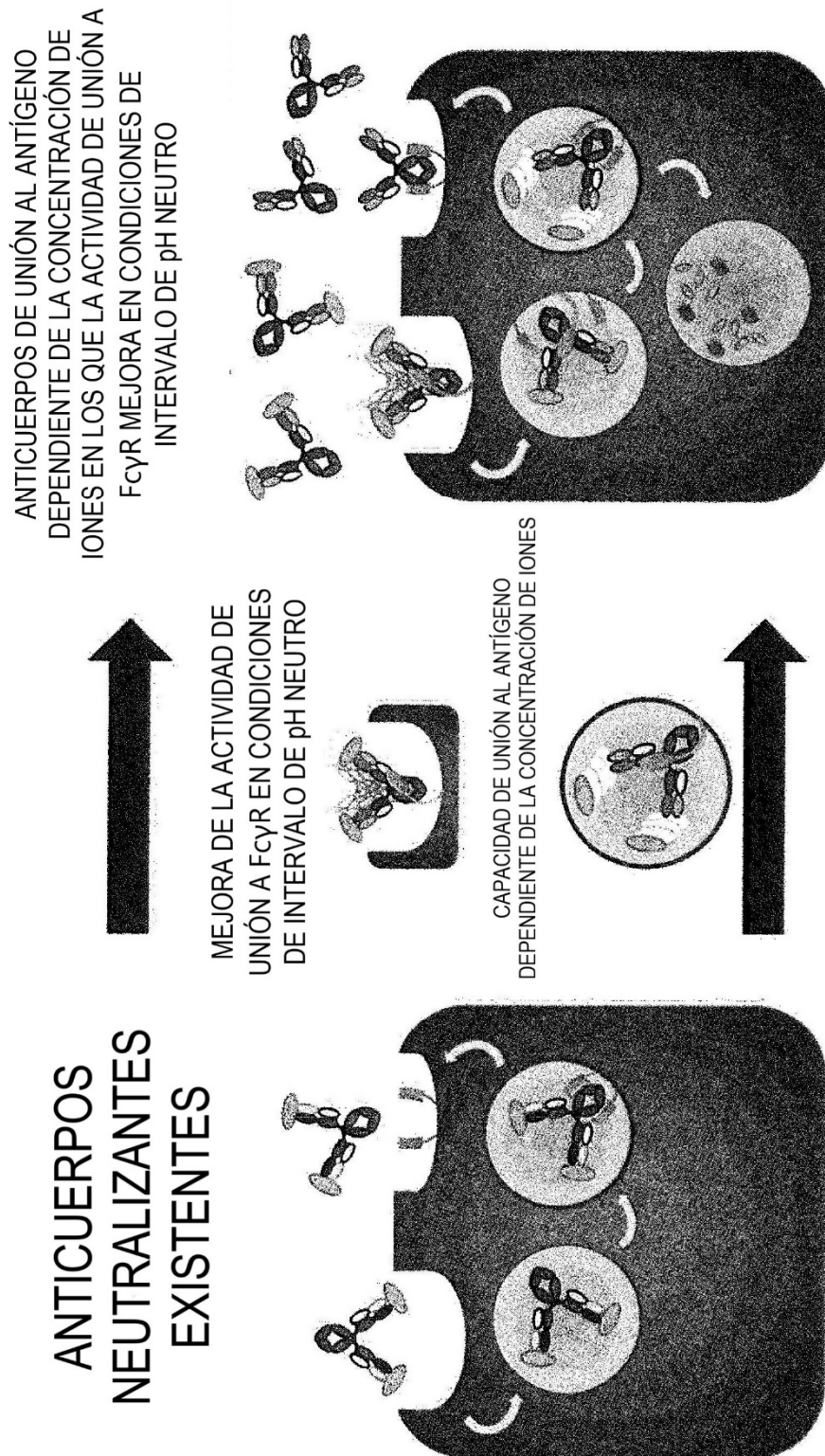


FIG. 1

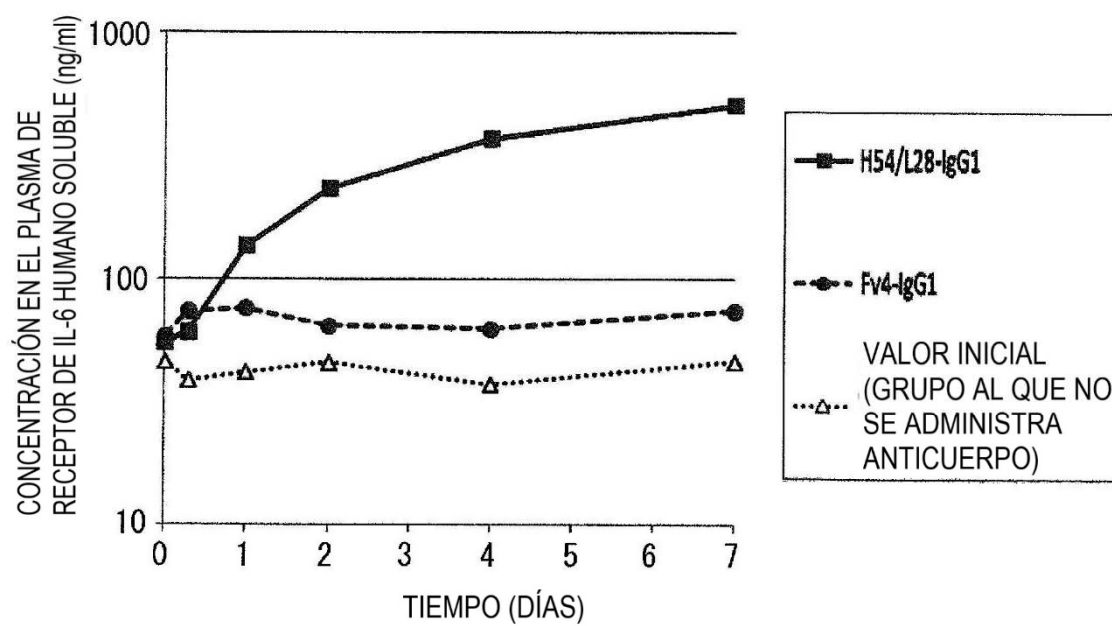


FIG. 2

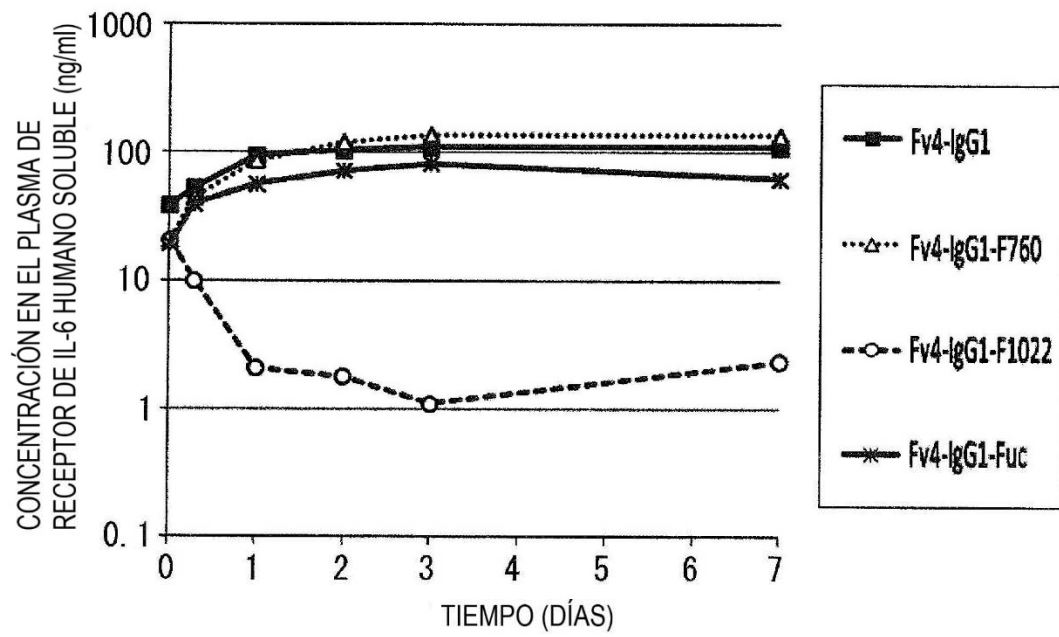


FIG. 3

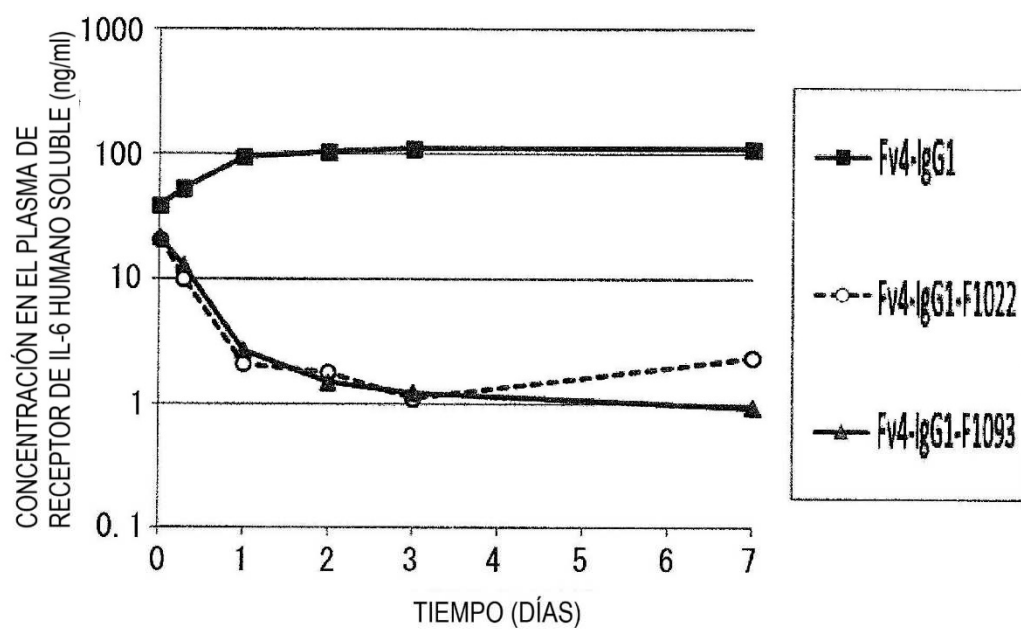


FIG. 4

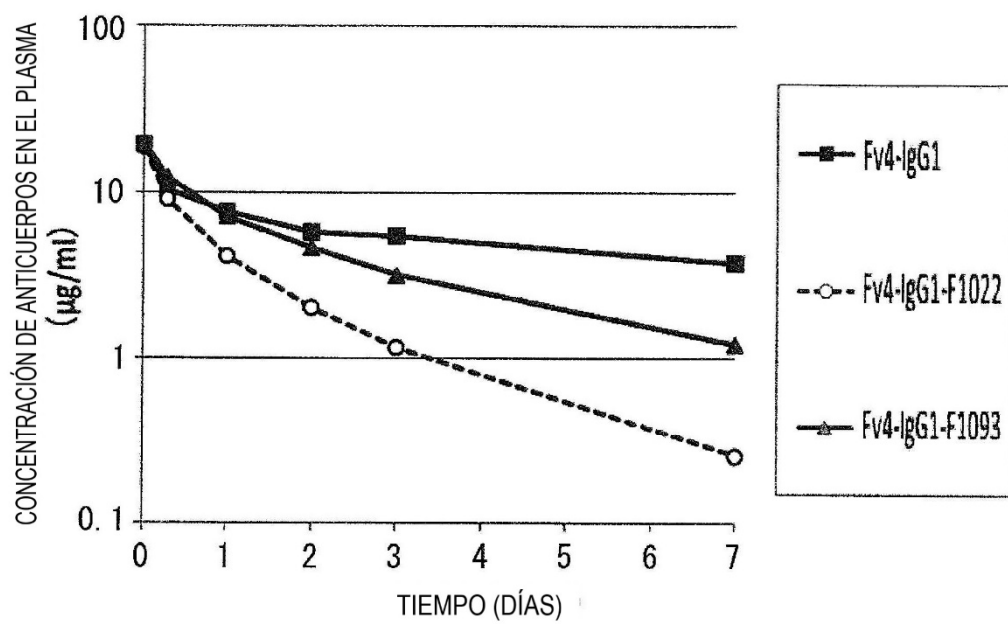


FIG. 5

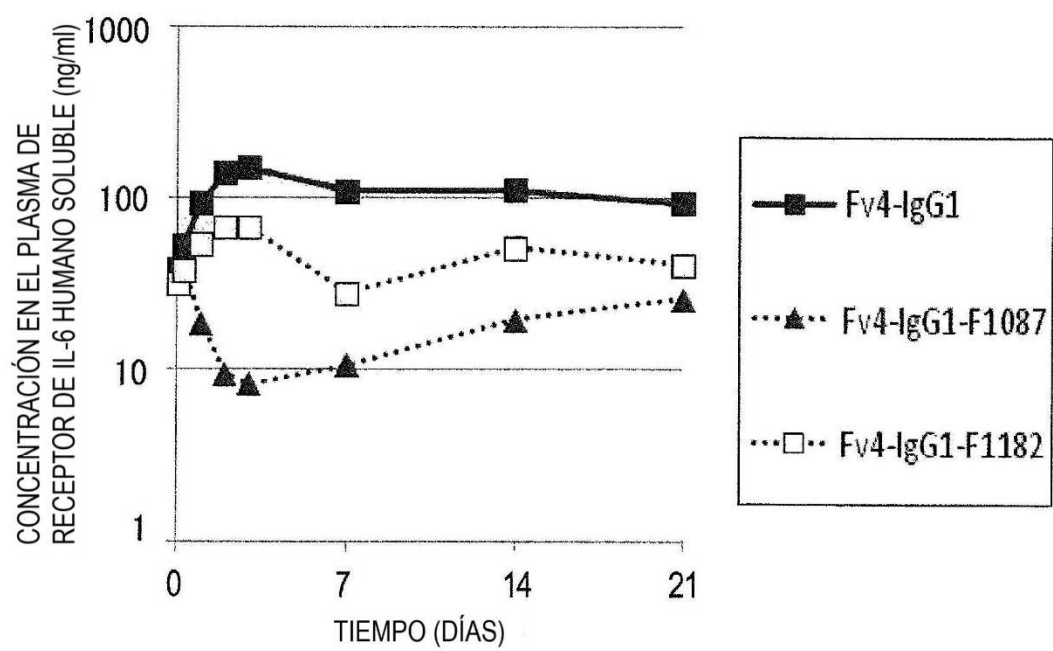


FIG. 6

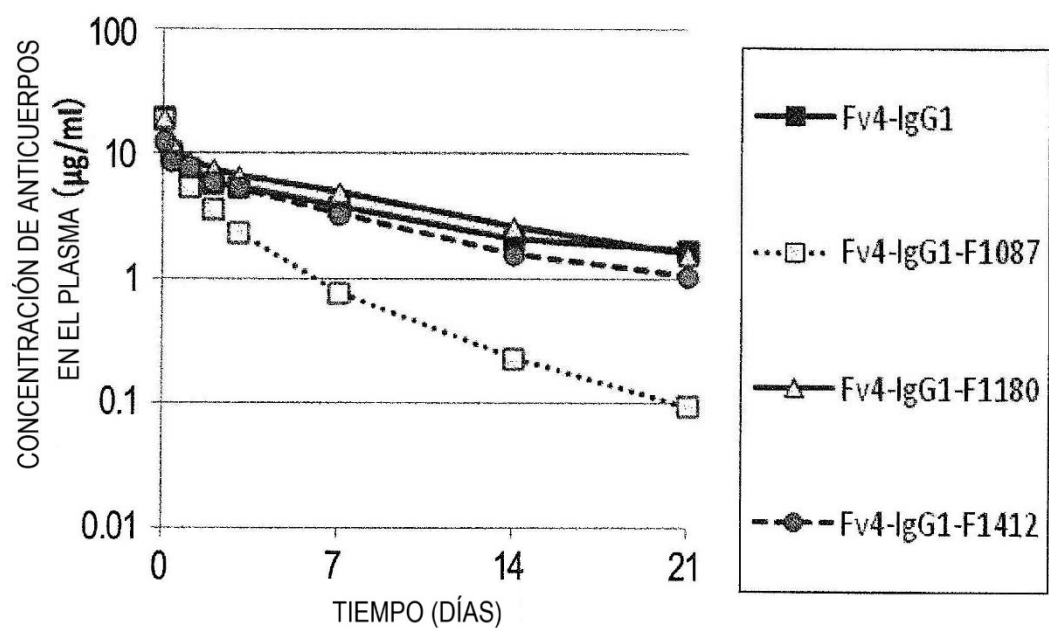


FIG. 7

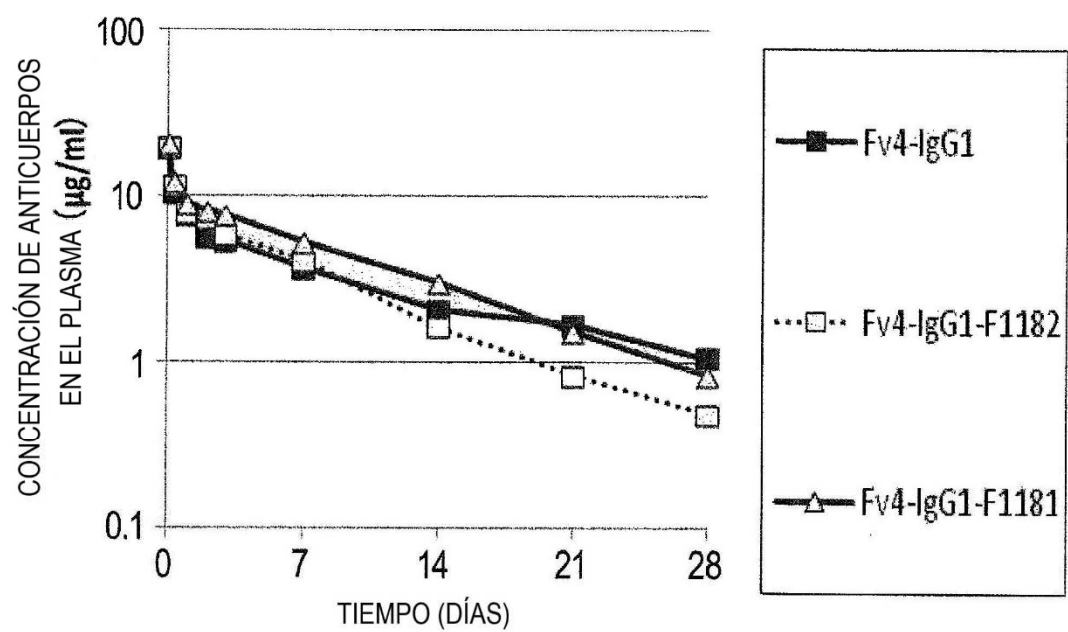


FIG. 8

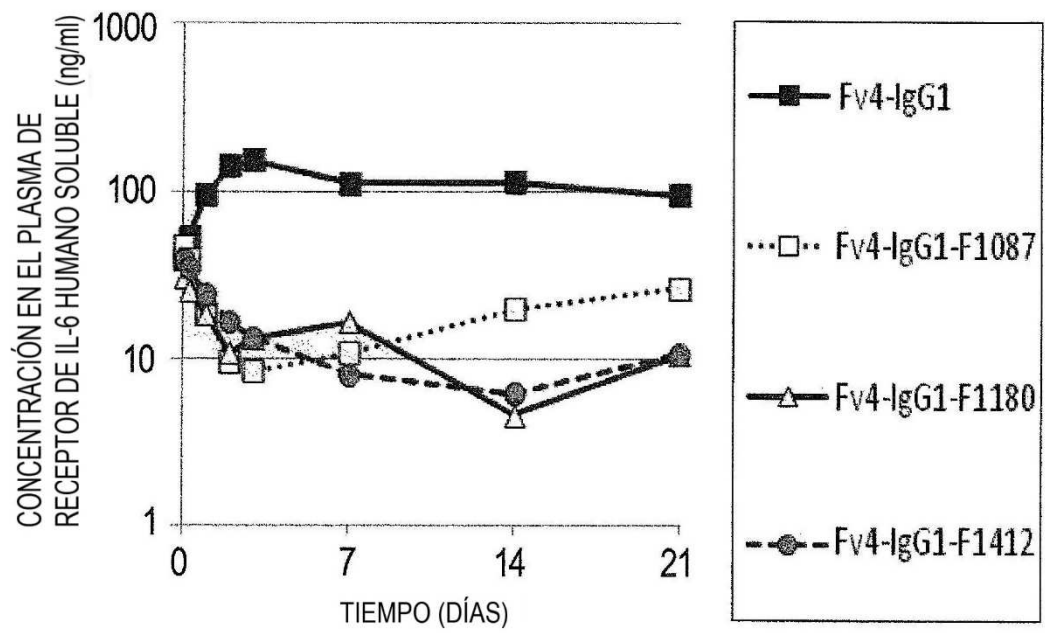


FIG. 9

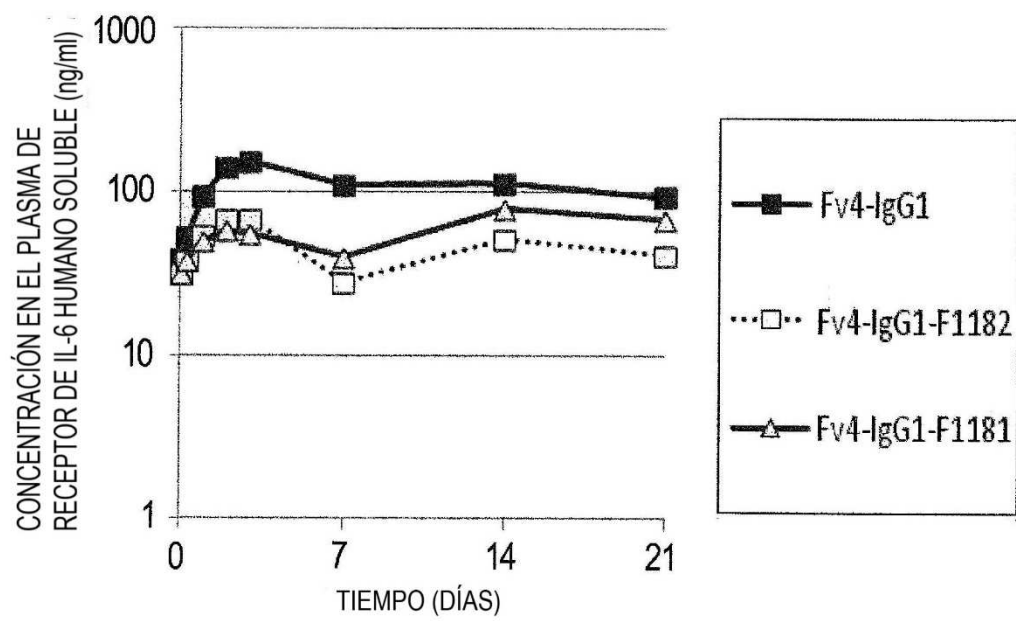


FIG. 10

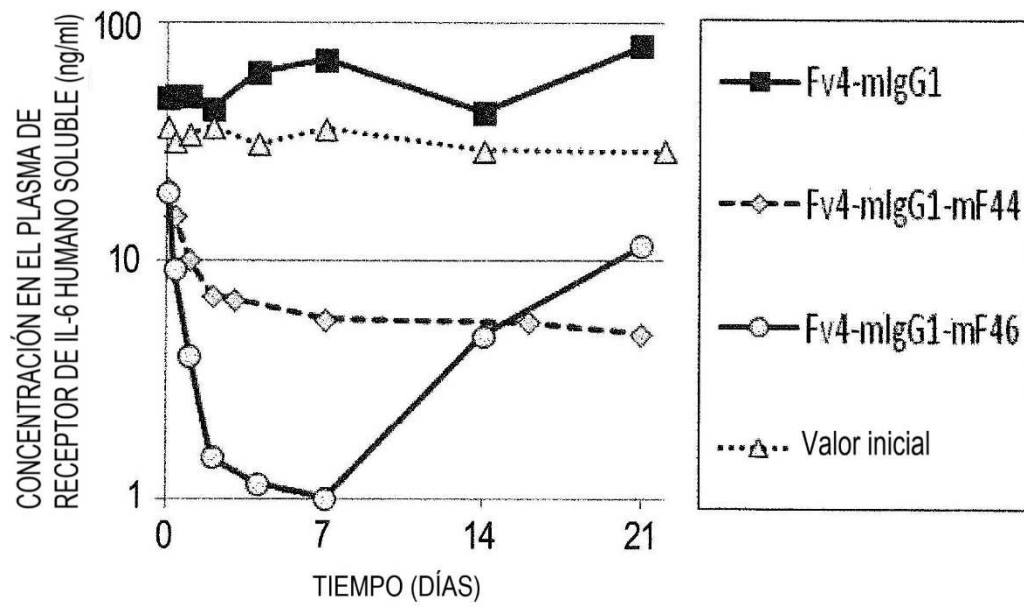


FIG. 11

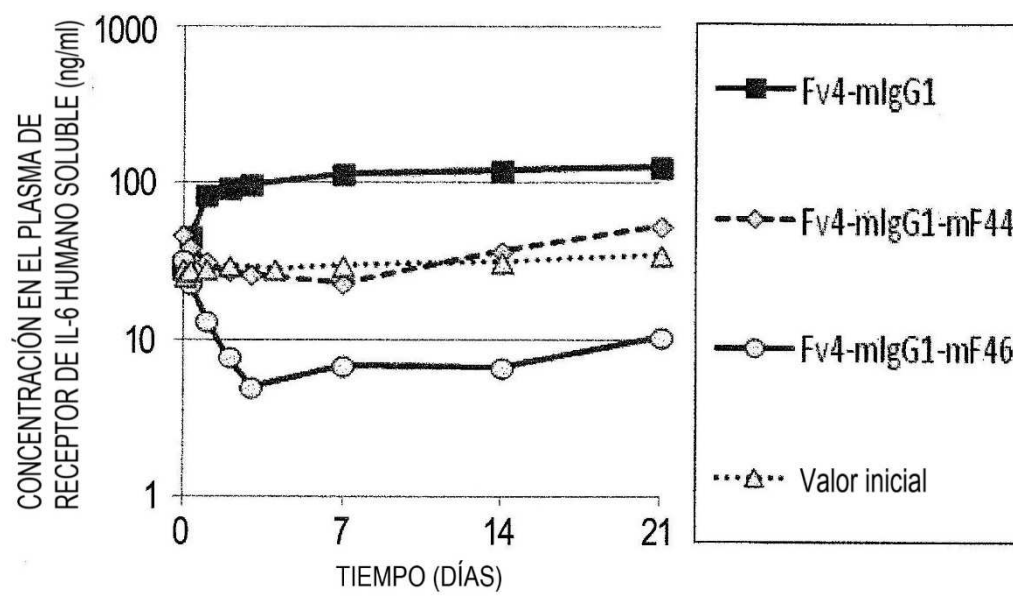


FIG. 12

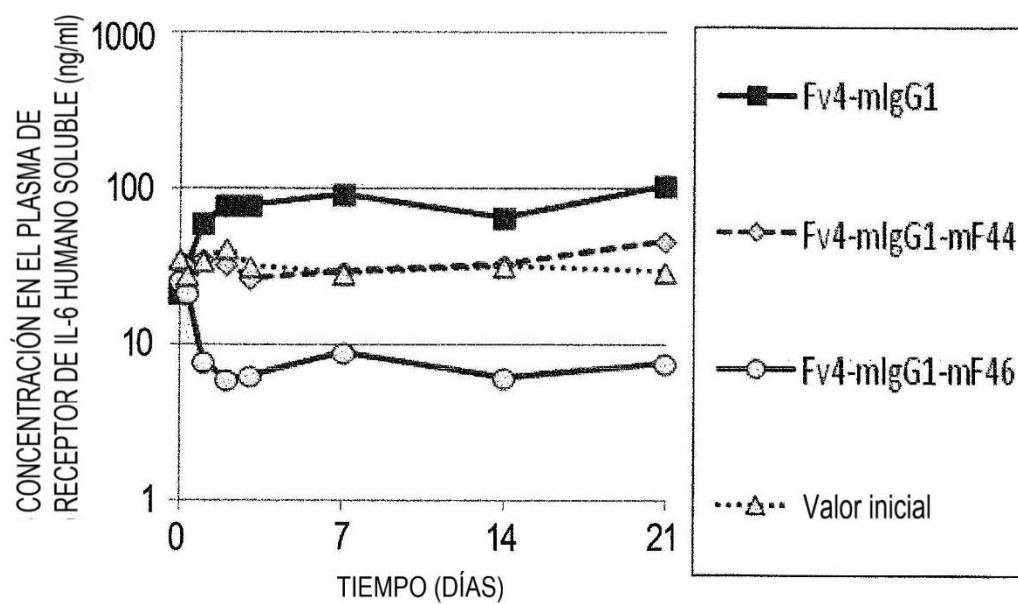


FIG. 13

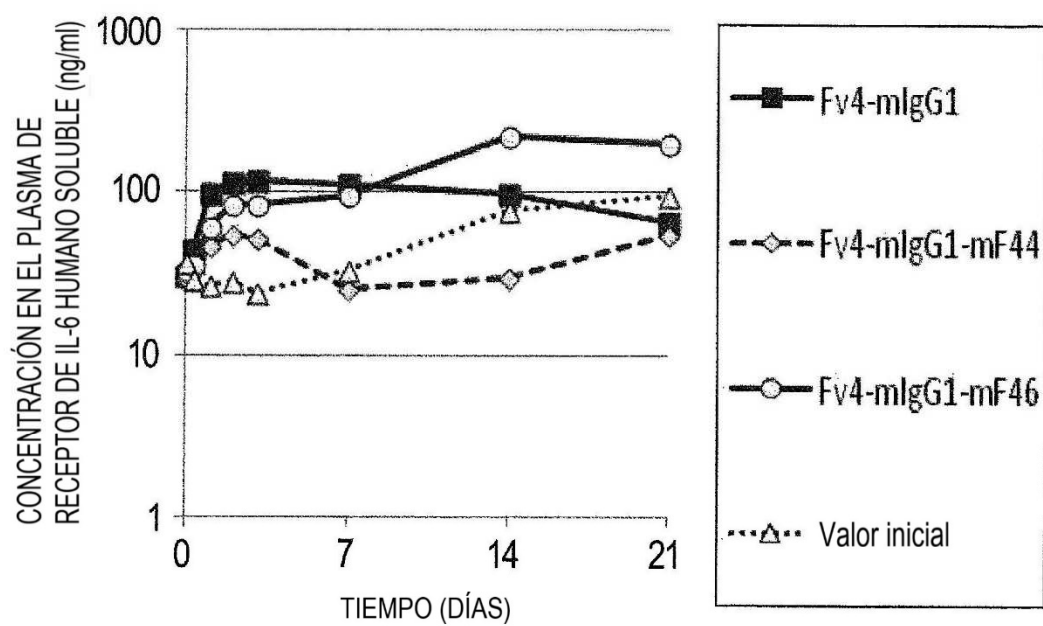


FIG. 14

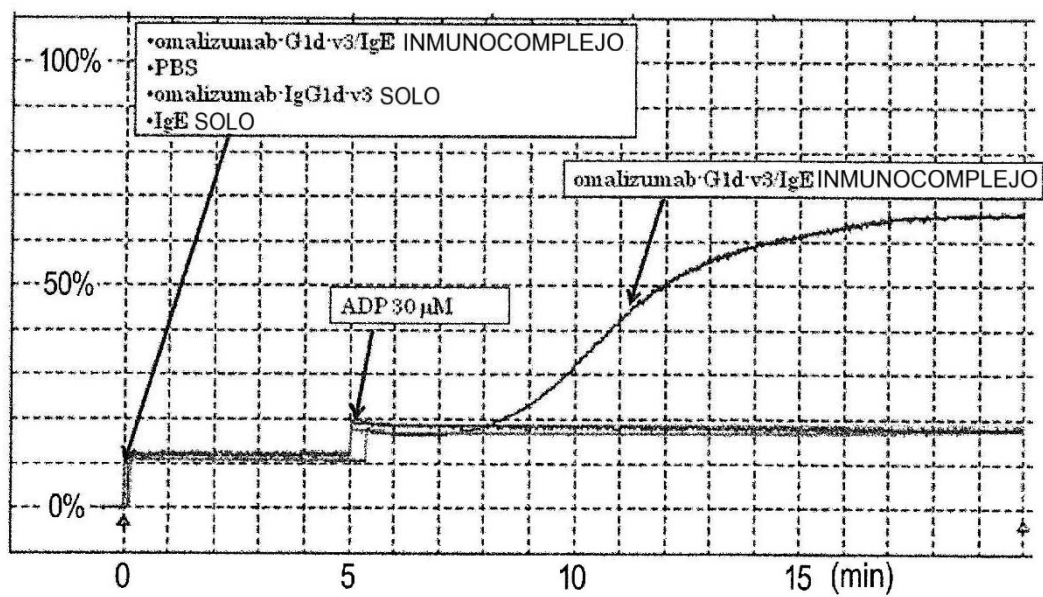


FIG. 15

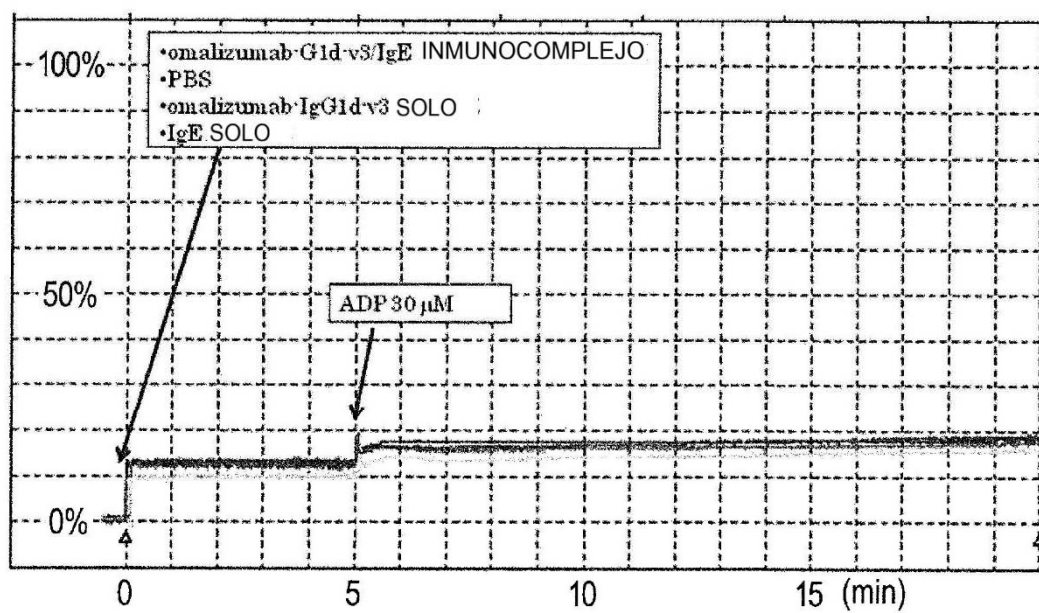


FIG. 16

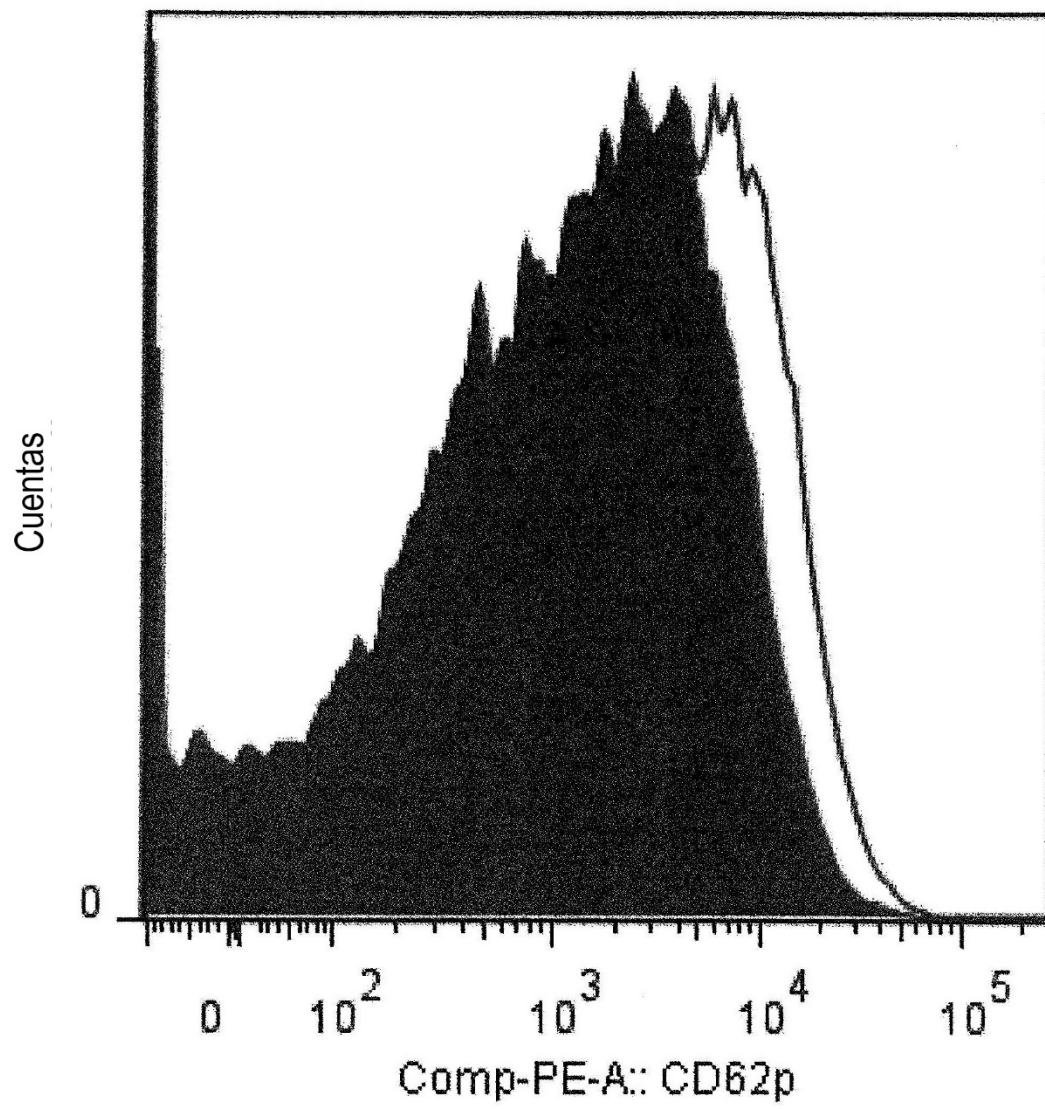


FIG. 17

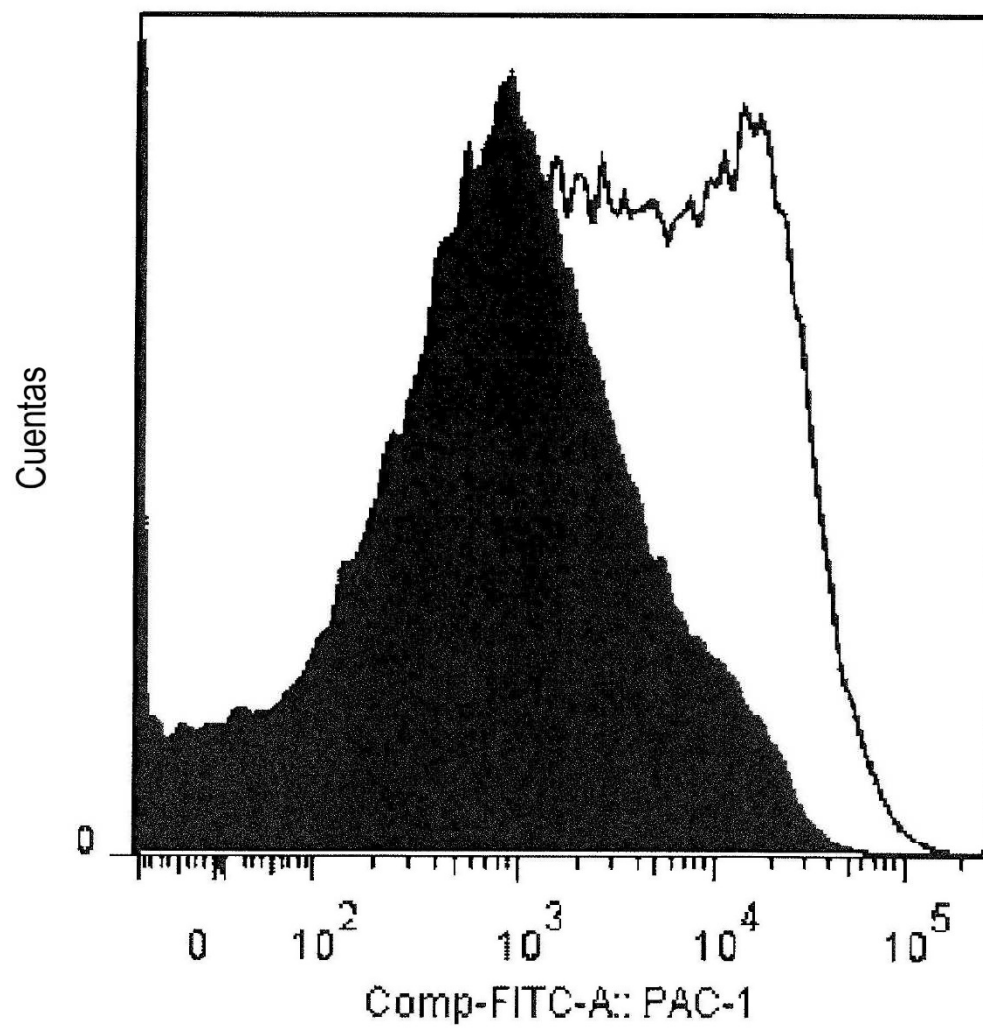


FIG. 18

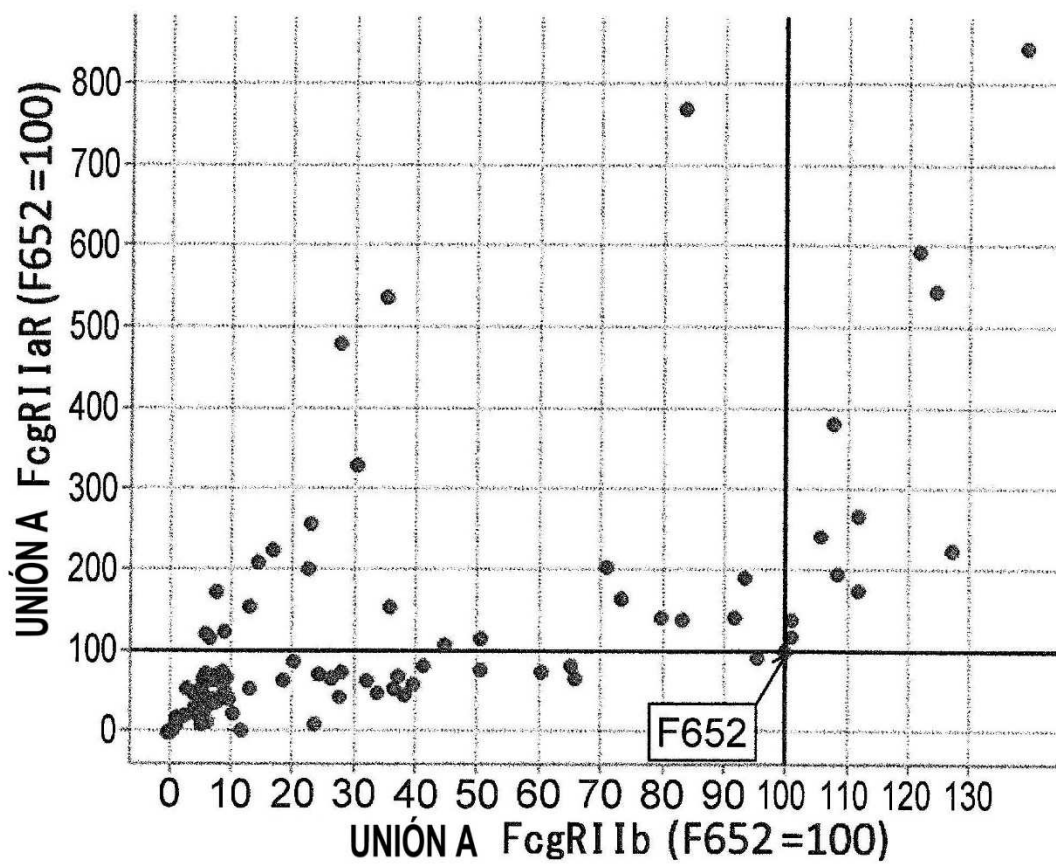


FIG. 19

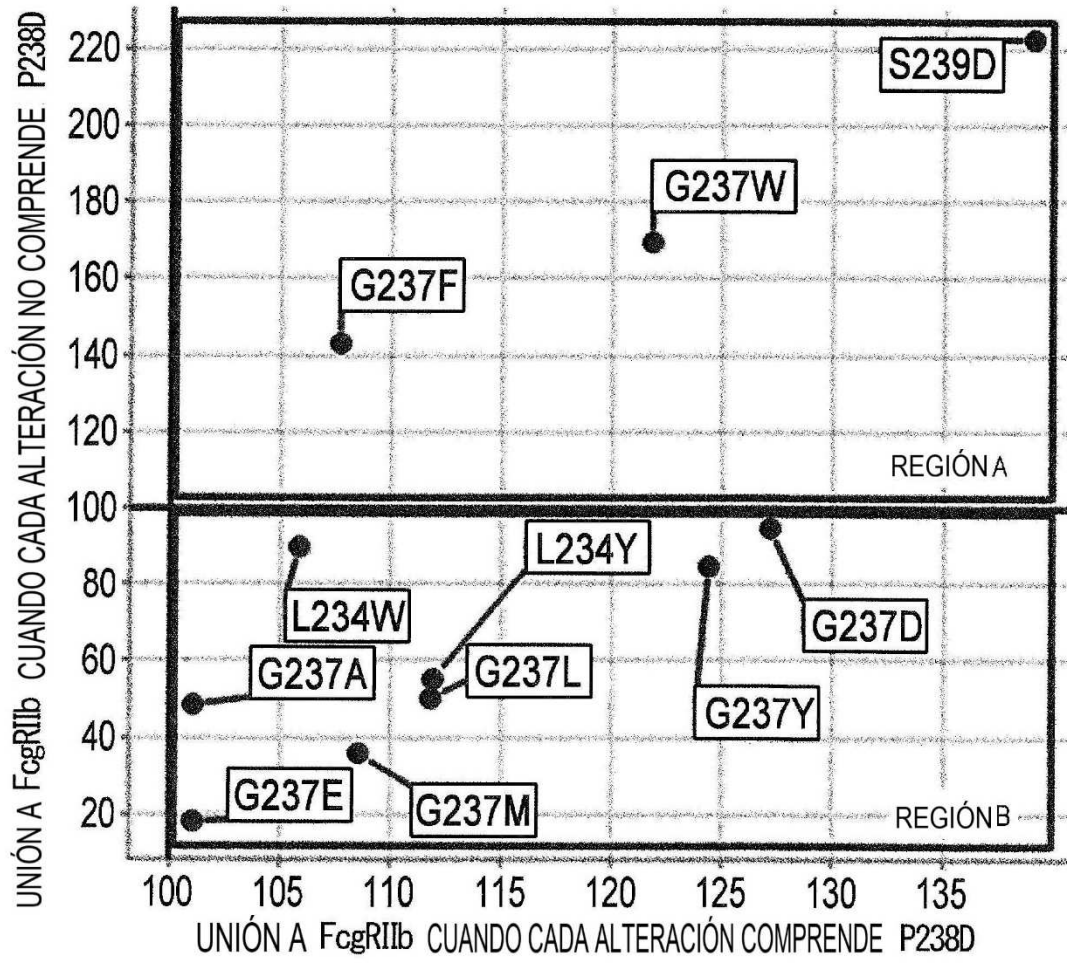


FIG. 20

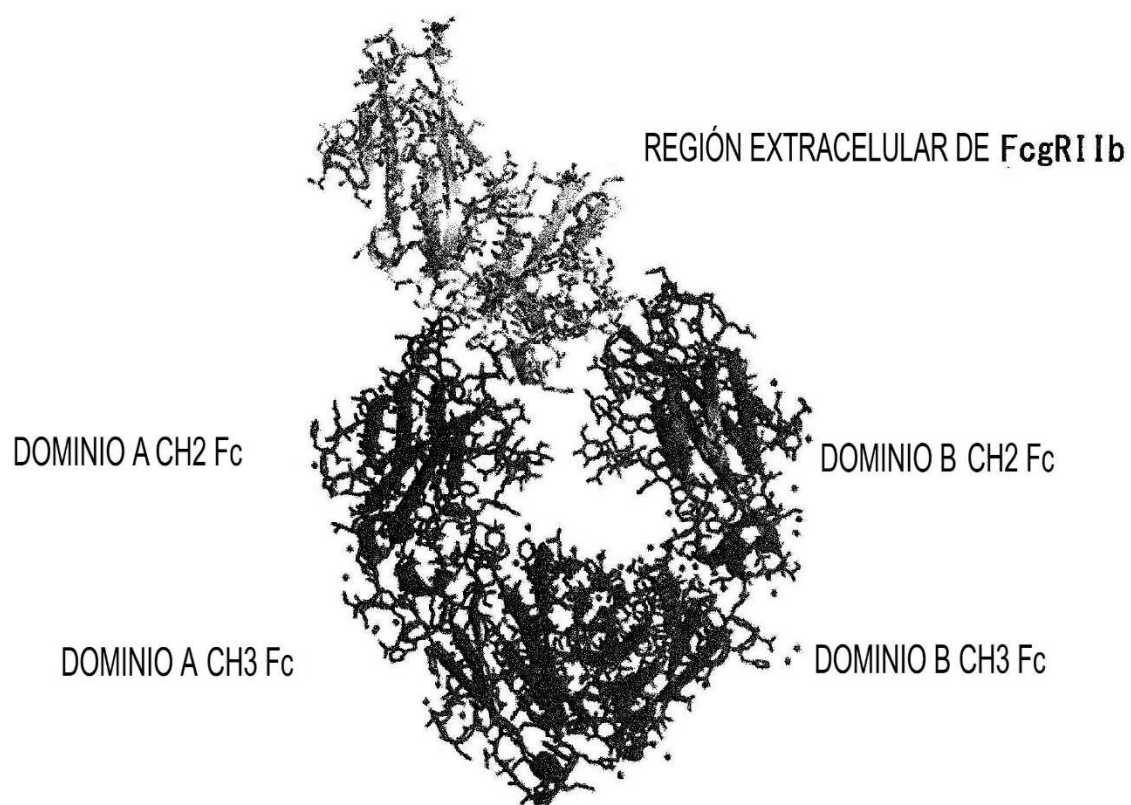
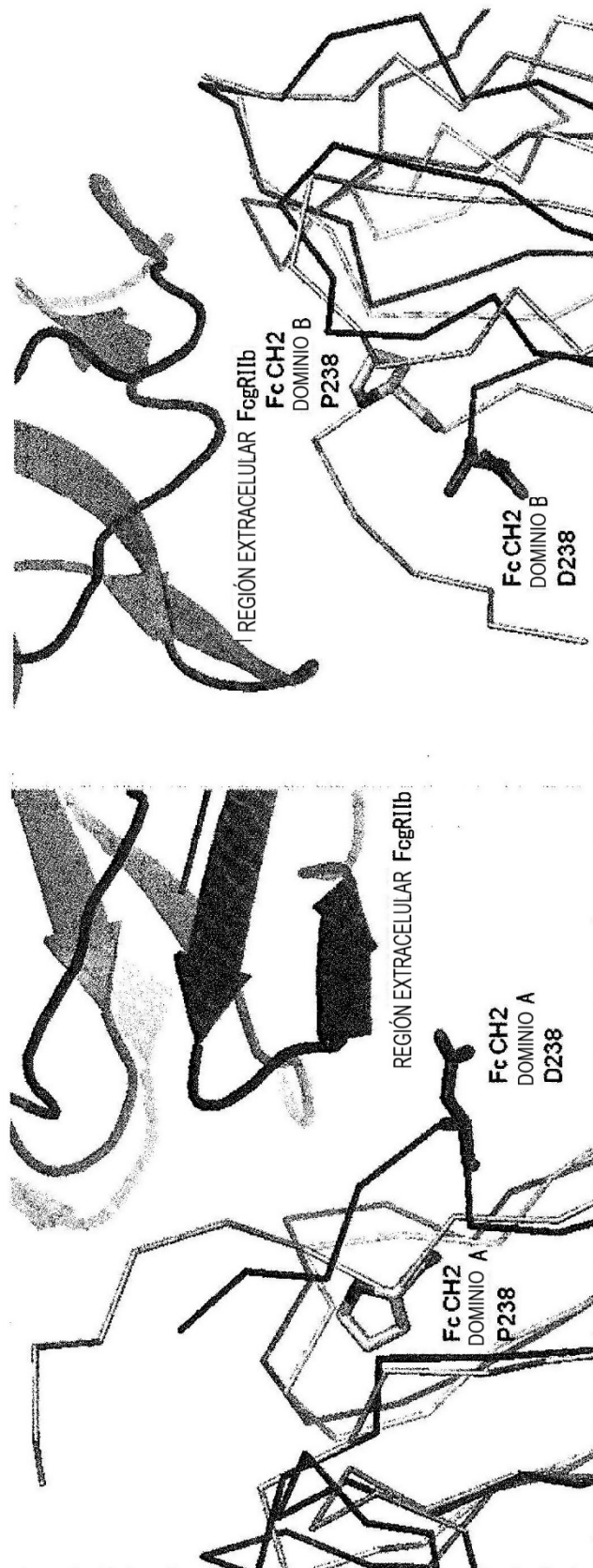


FIG. 21



FIG. 22

FIG. 23



NEGRO ESTRUCTURA CRISTALINA DE COMPLEJO DE Fc (P238D)/REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIb

GRIS ESTRUCTURA MODELO DE COMPLEJO DE Fc (WT)/REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIb

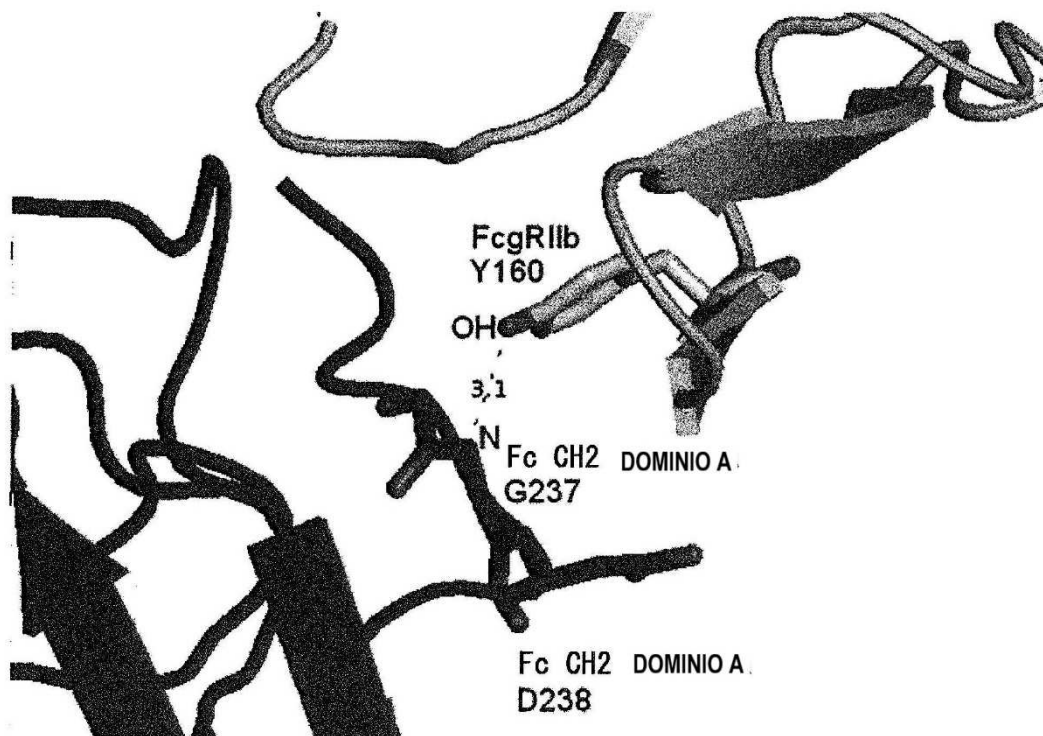


FIG. 24

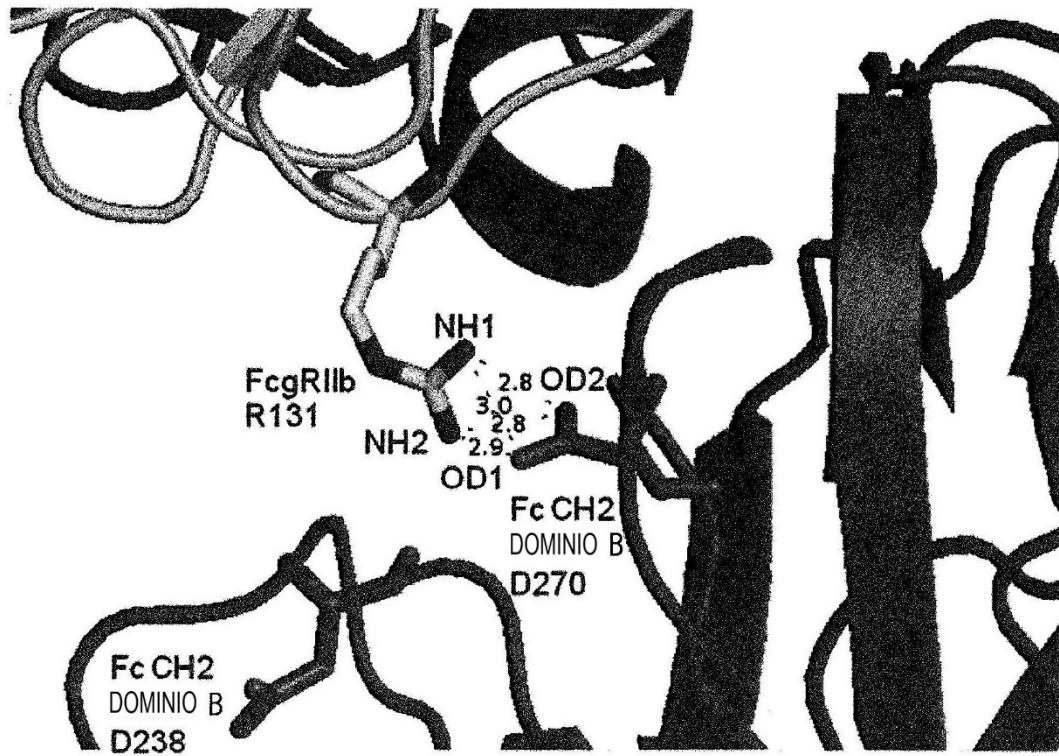


FIG. 25

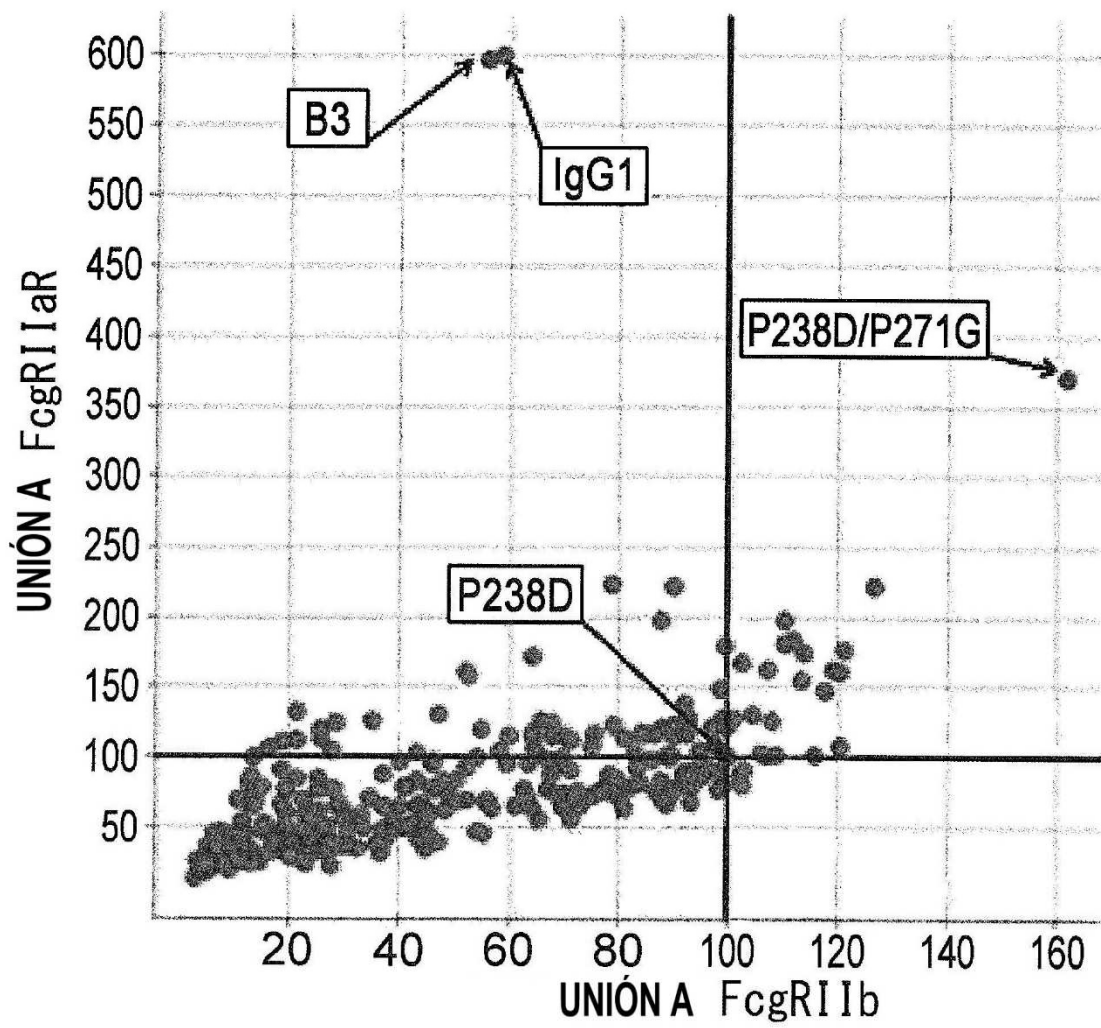


FIG. 26

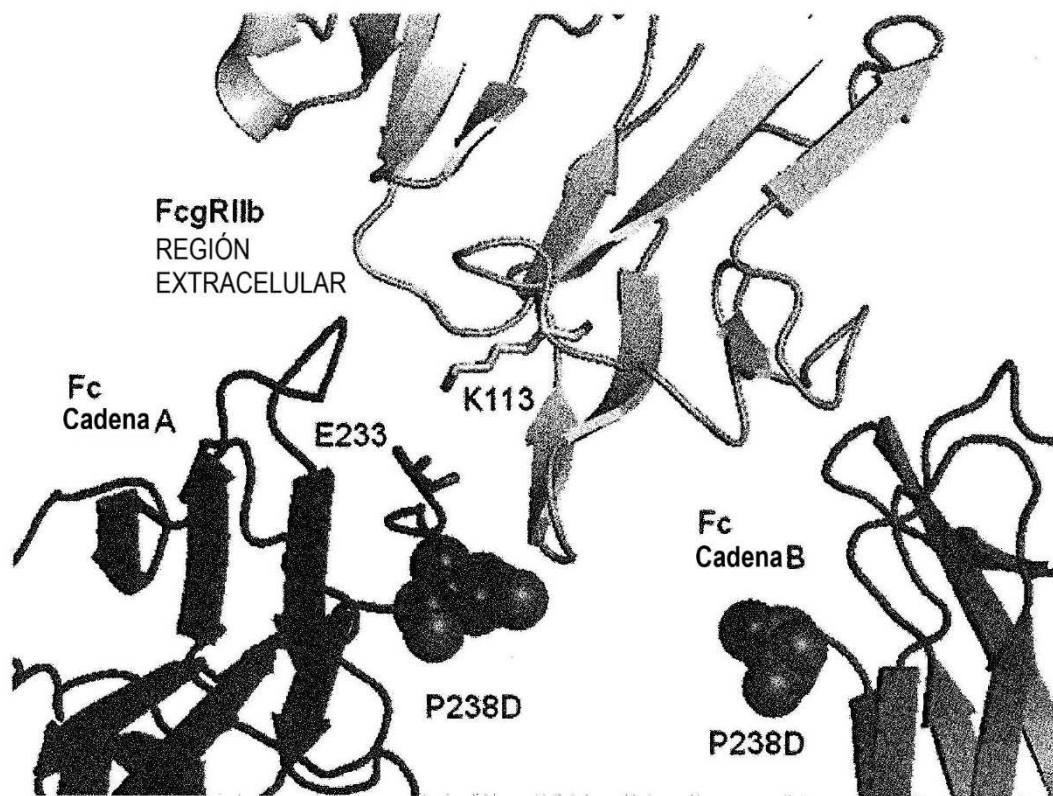


FIG. 27

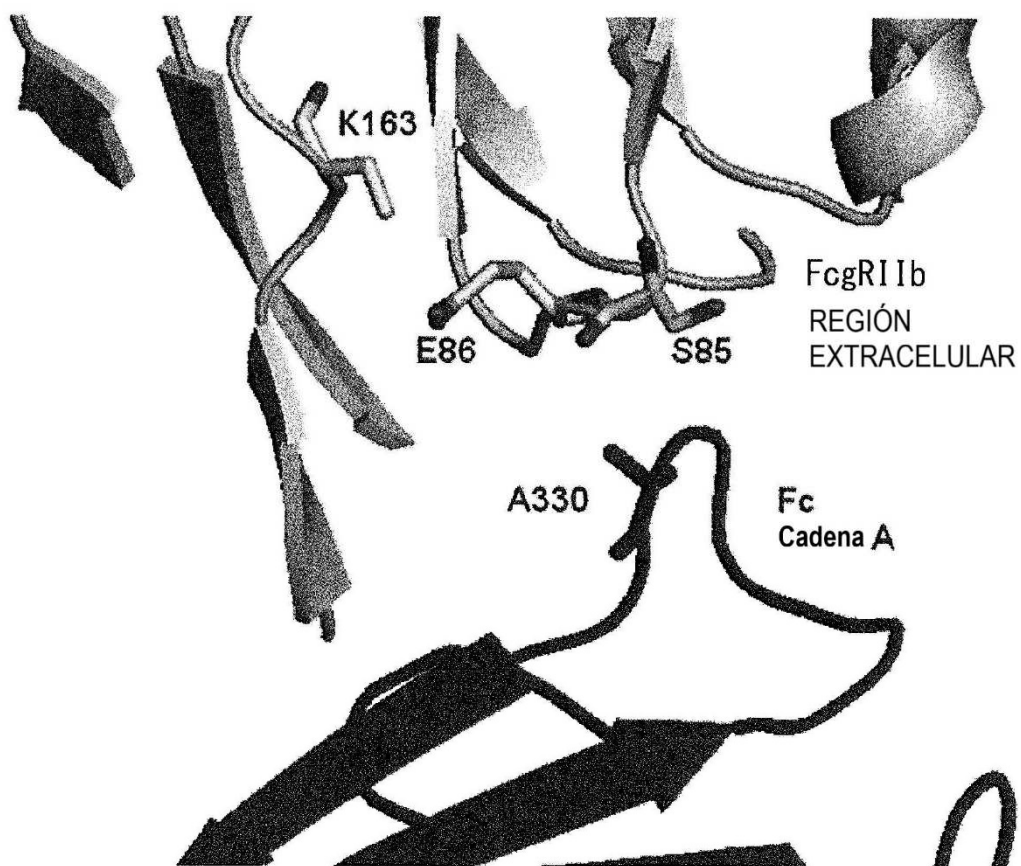
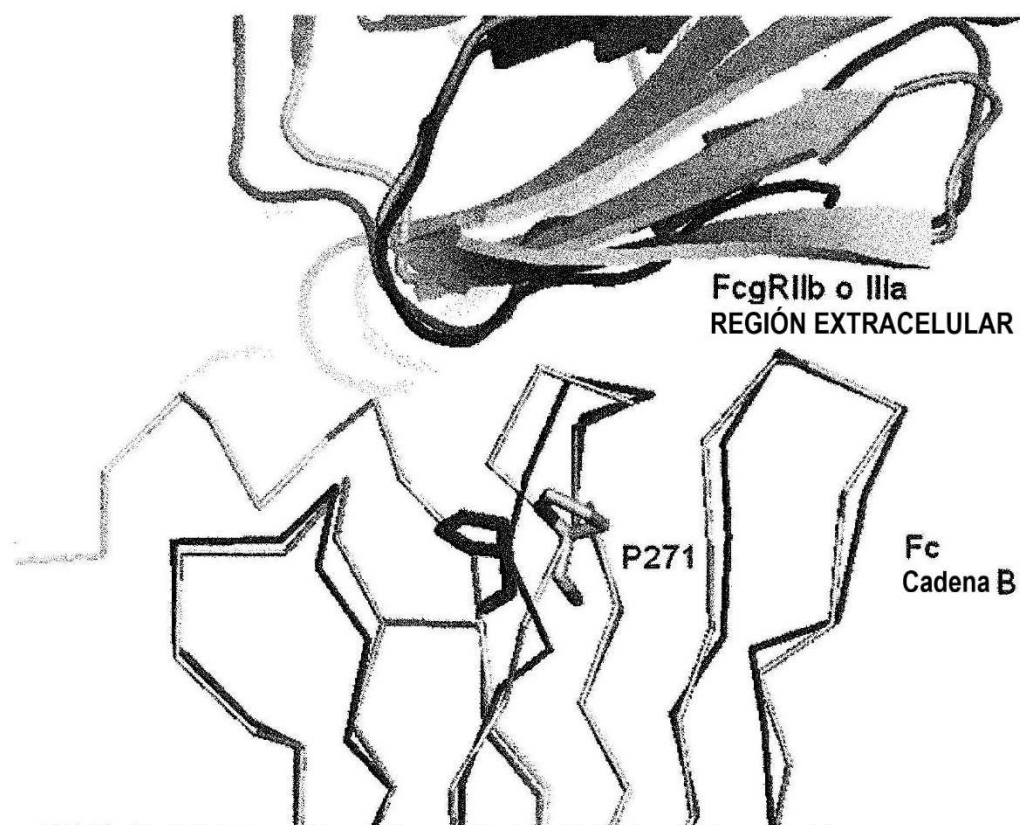


FIG. 28



NEGRO ESTRUCTURA CRISTALINA DE COMPLEJO DE Fc(P238D)/REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIb
 GRIS ESTRUCTURA MODELO DE COMPLEJO DE Fc(WT)/REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIIa (código PDB: 3SGJ)

FIG. 29

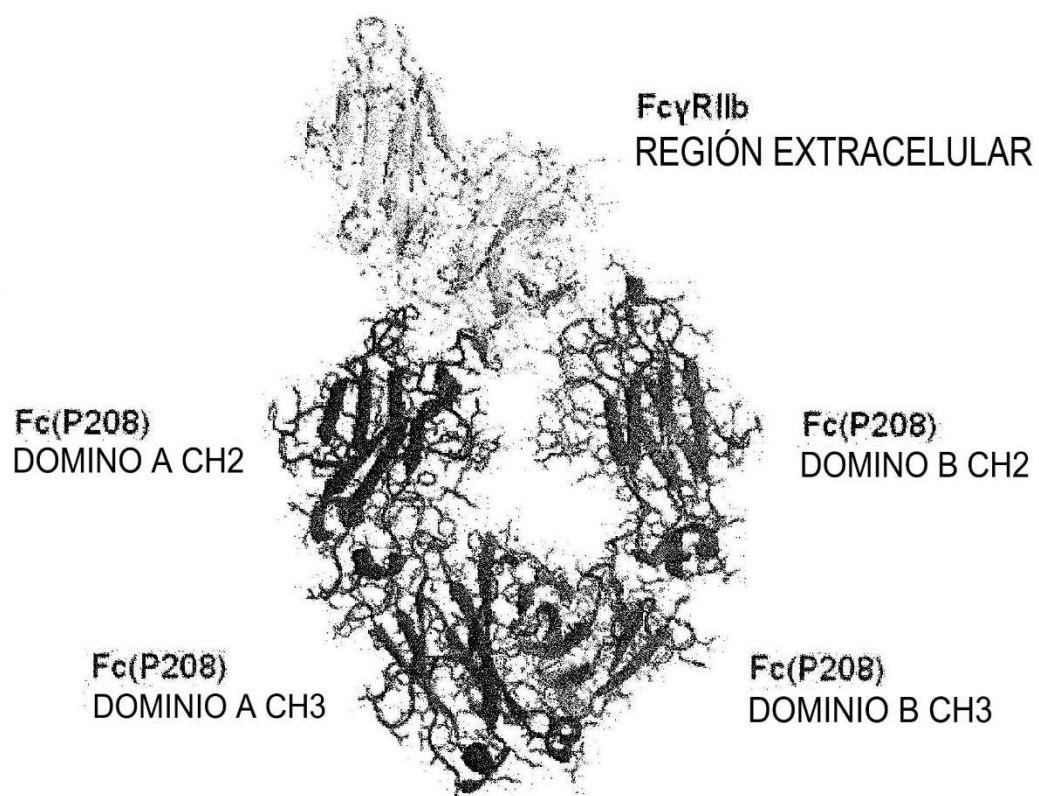


FIG. 30

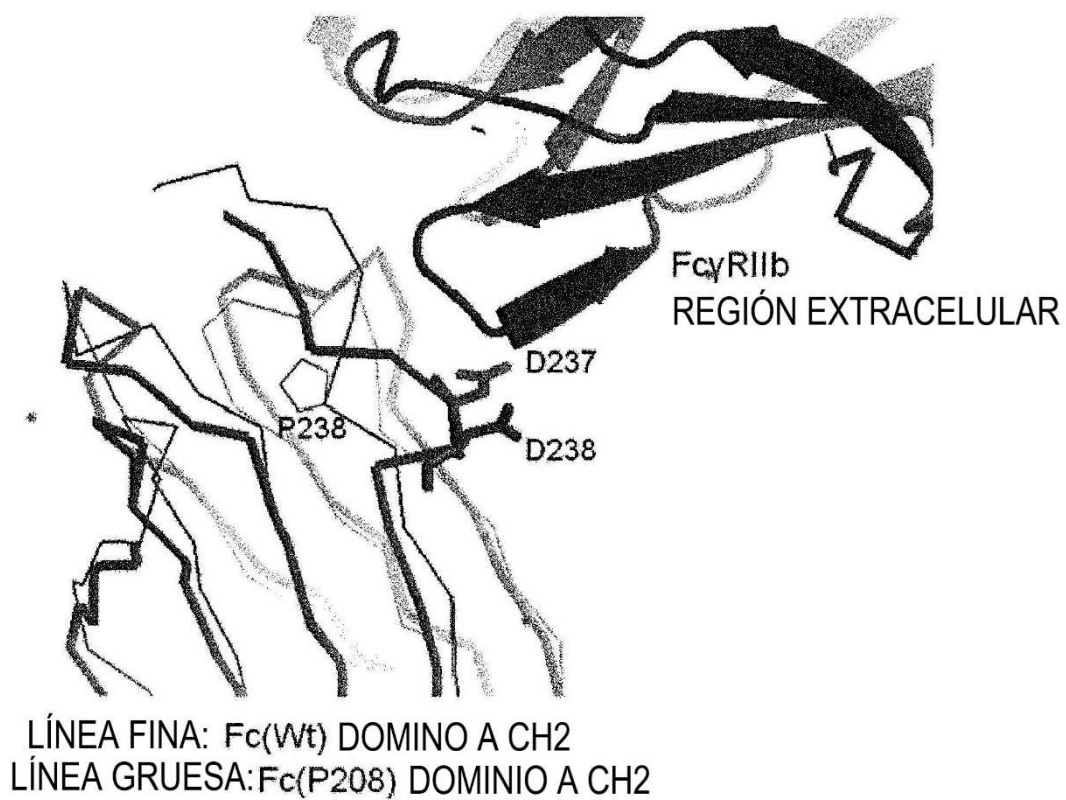


FIG. 31

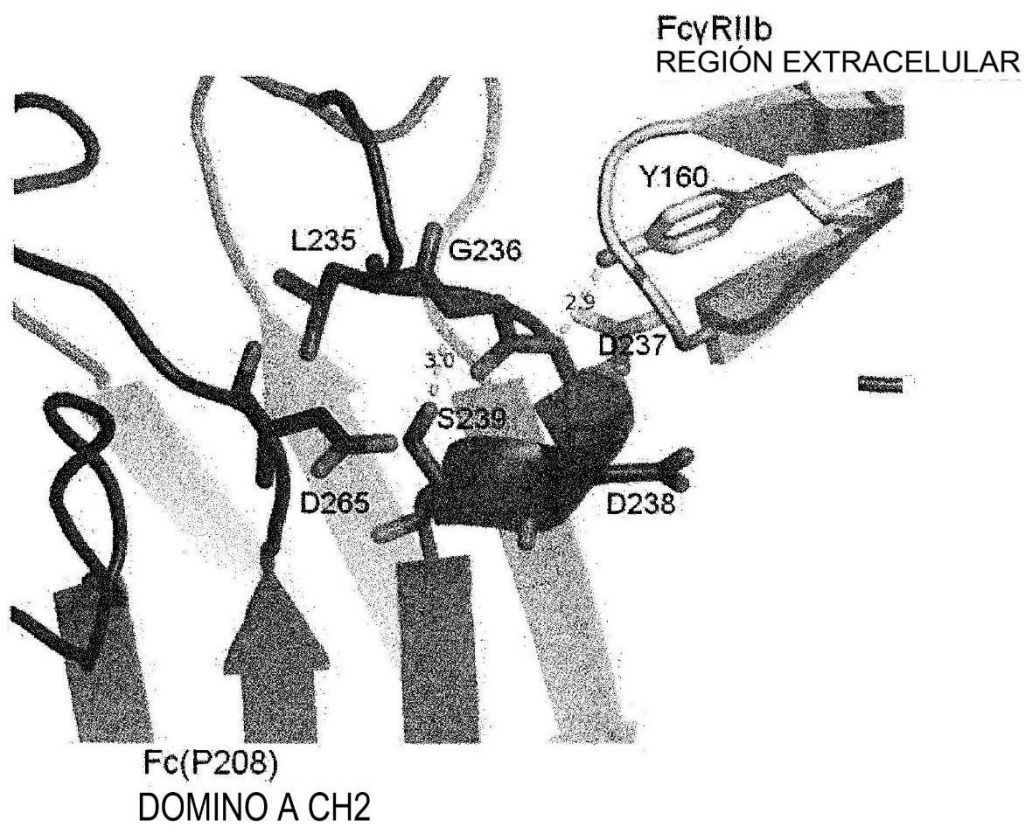


FIG. 32

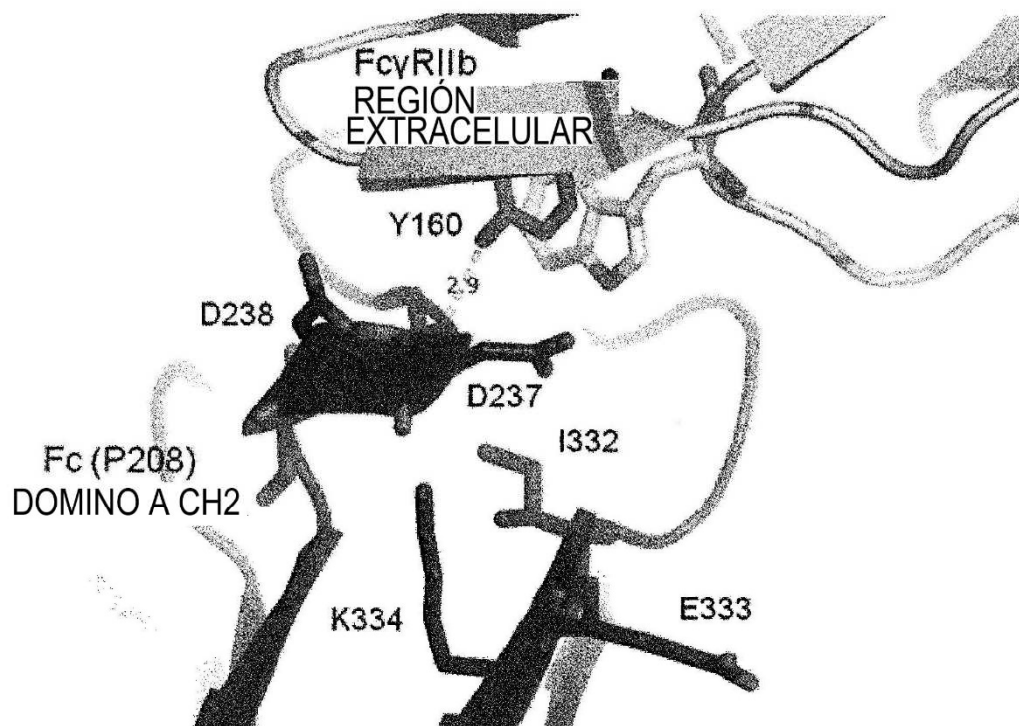
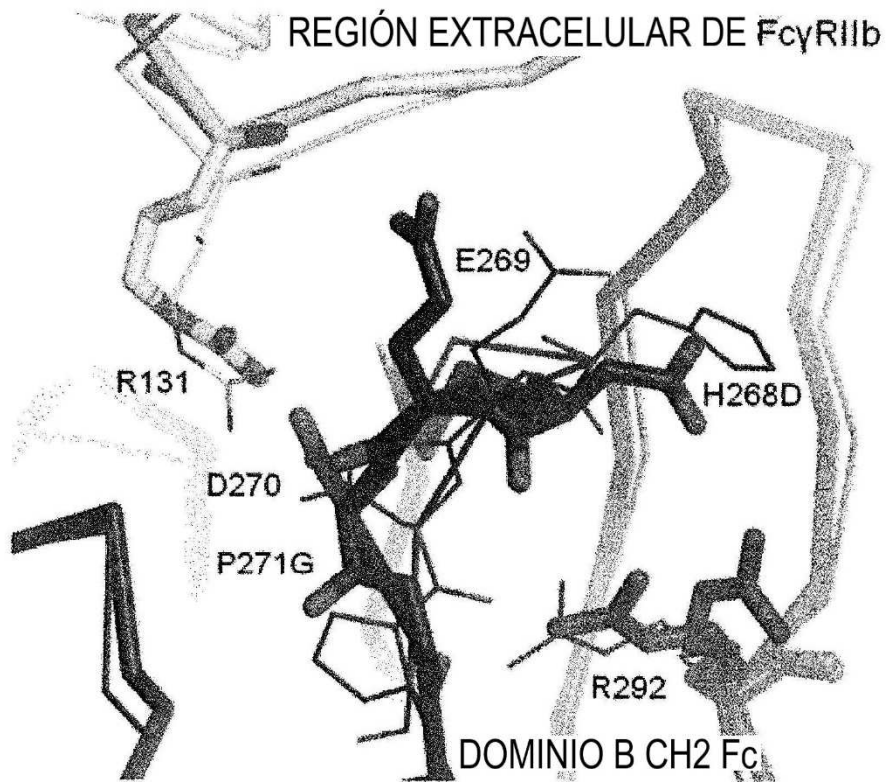


FIG. 33



LÍNEA FINA: ESTRUCTURA CRISTALINA DE RAYOS X DE COMPLEJO DE Fc(P238D)/
REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIb

LÍNEA GRUESA: ESTRUCTURA CRISTALINA DE RAYOS X DE COMPLEJO DE Fc(P208)/
REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIb

FIG. 34

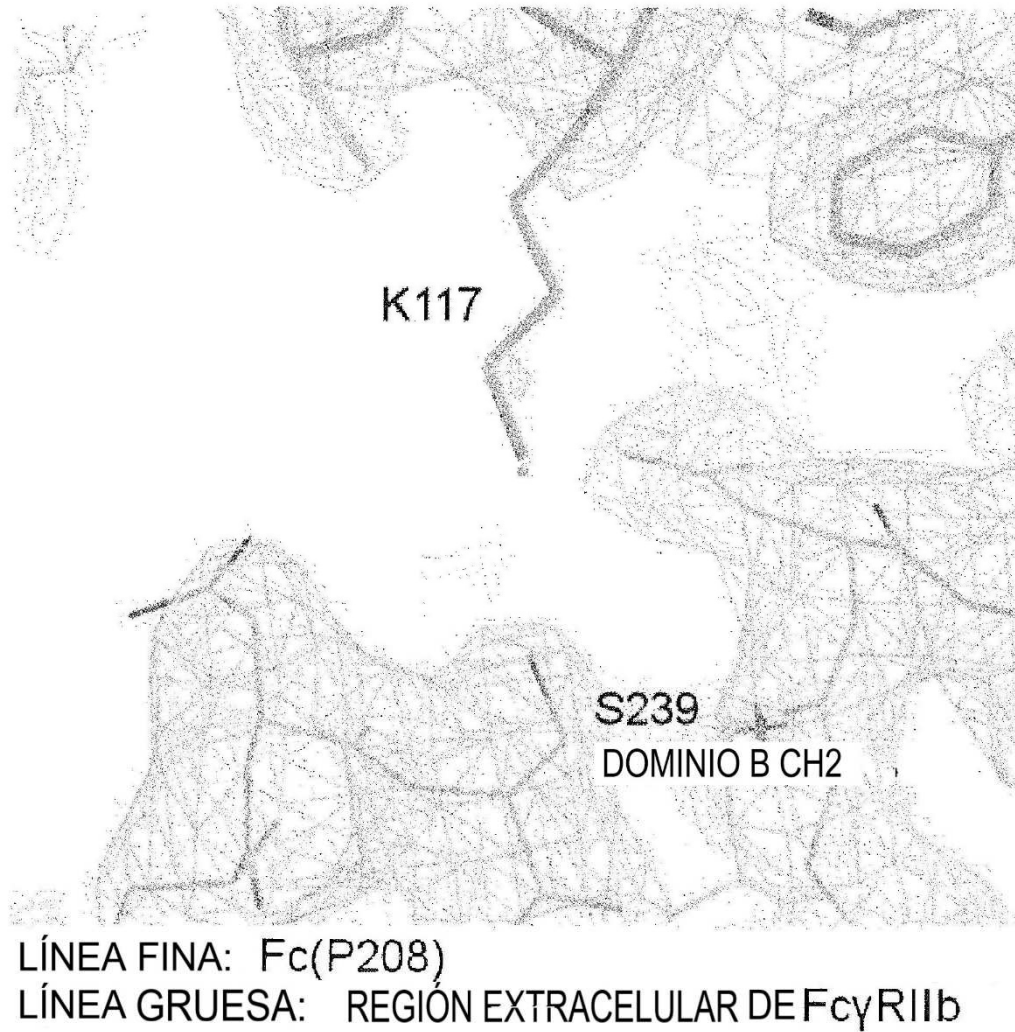
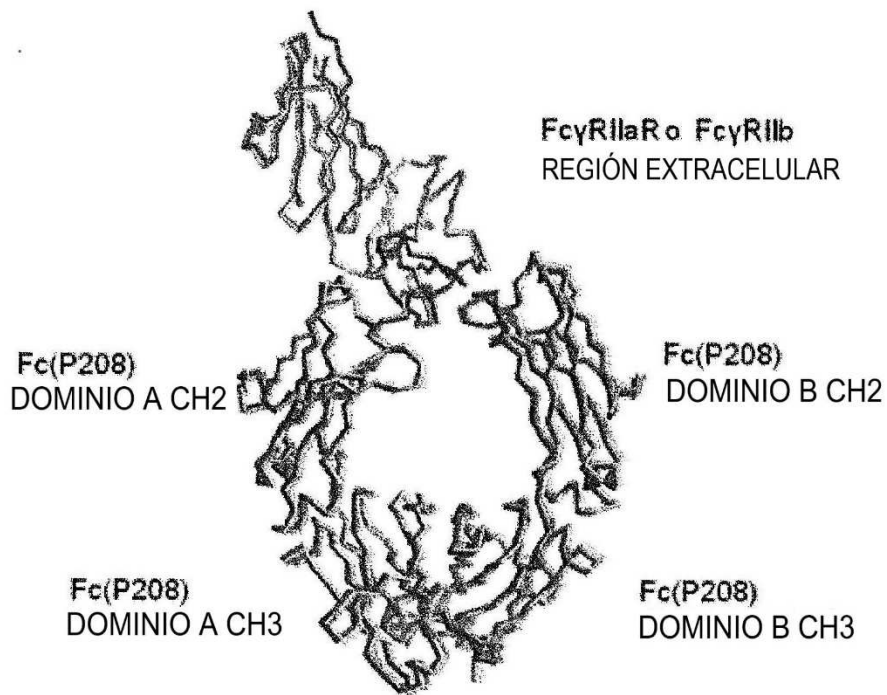


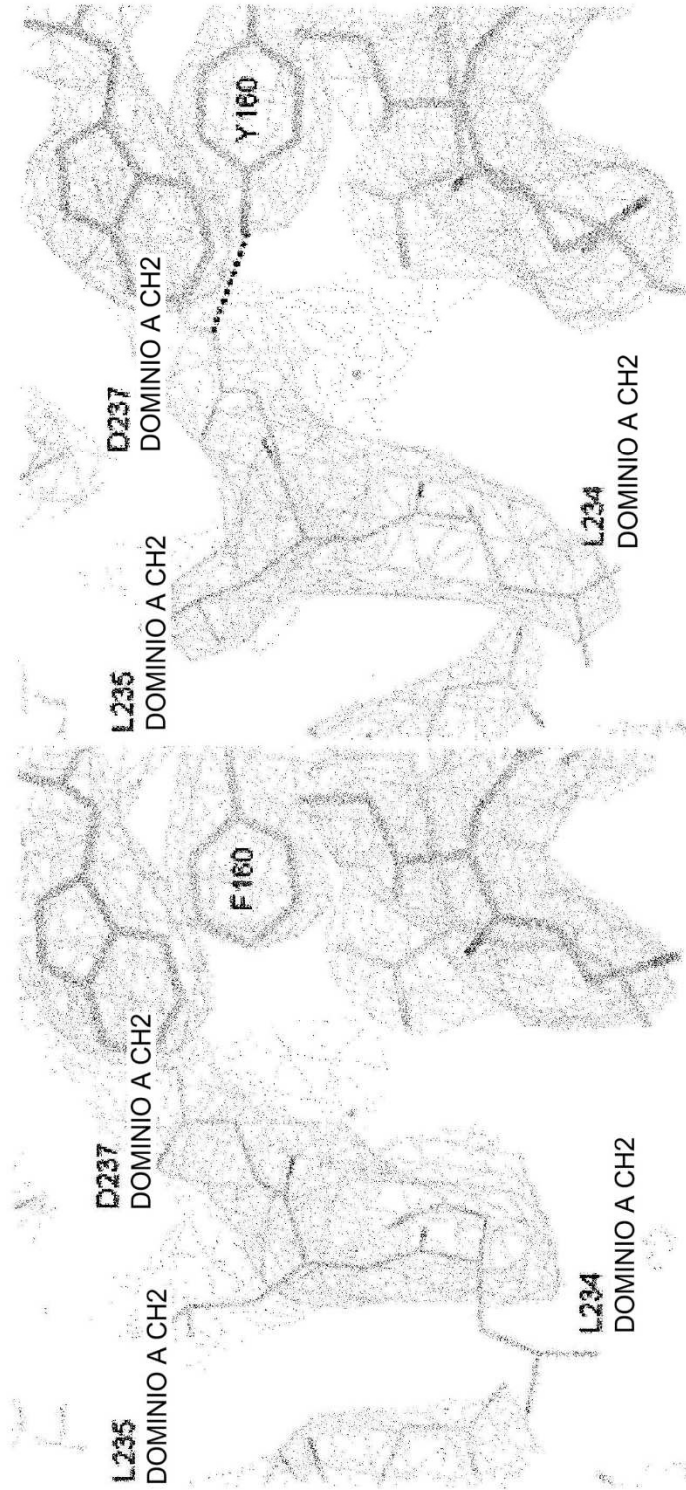
FIG. 35



NEGRO: ESTRUCTURA CRISTALINA DE RAYOS X DE COMPLEJO
DE Fc(P208)/REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIaR
GRIS: ESTRUCTURA CRISTALINA DE RAYOS X DE COMPLEJO DE
Fc(P208)/REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIb

FIG. 36

FIG. 37



LÍNEA FINA: Fc(P208)

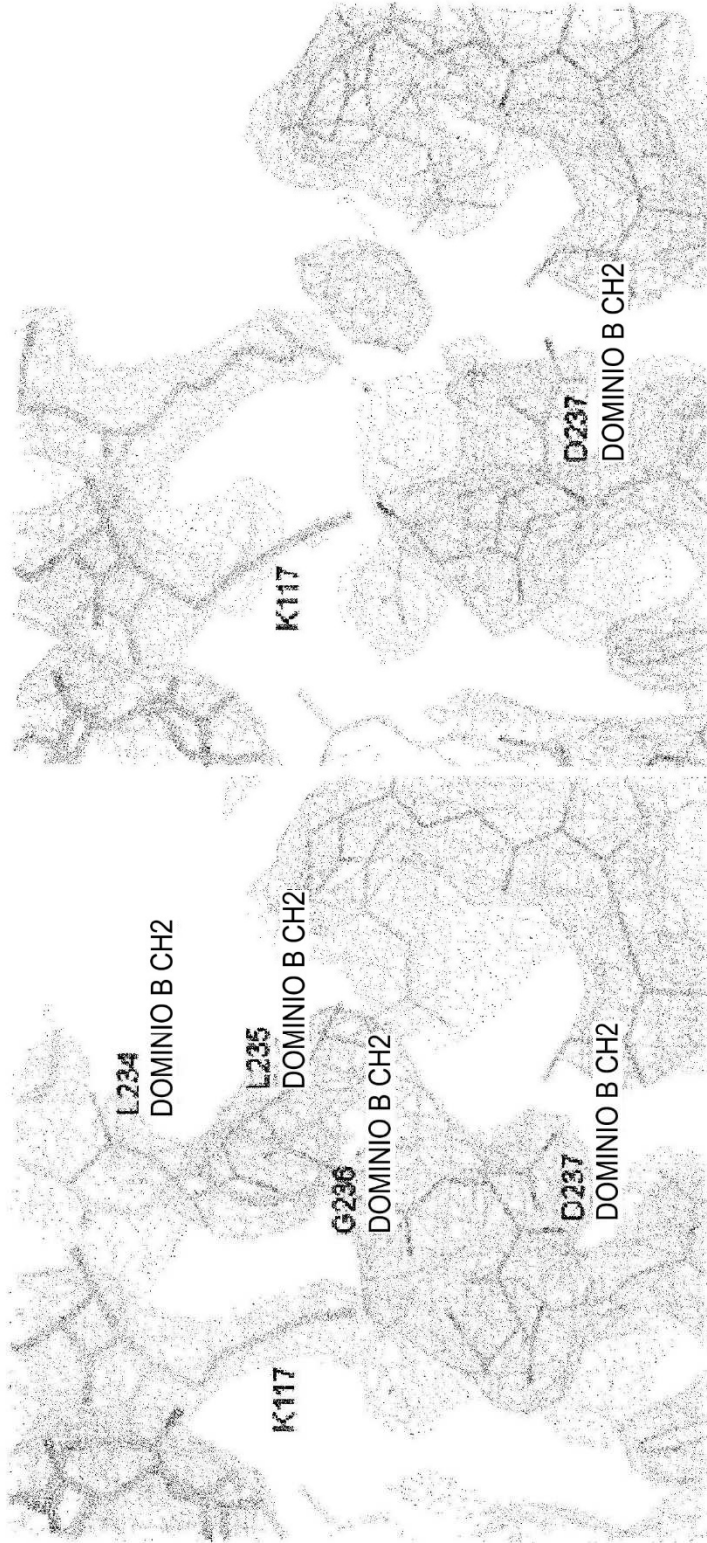
LÍNEA GRUESA: REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIaR O FcγRIIb

IZQUIERDA: ESTRUCTURA CRISTALINA DE RAYOS X DE COMPLEJO DE Fc(P208)/

REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIaR

DERECHA: ESTRUCTURA CRISTALINA DE RAYOS X DE COMPLEJO DE Fc(P208)/

REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIb



LÍNEA FINA: Fc(P208)

LÍNEA GRUESA: REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIaR O FcγRIIb

IZQUIERDA: ESTRUCTURA CRISTALINA DE RAYOS X DE COMPLEJO DE Fc(P208)/

REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIaR

DERECHA: ESTRUCTURA CRISTALINA DE RAYOS X DE COMPLEJO DE Fc(P208)/

REGIÓN EXTRACELULAR DE FcγRIIb

FIG. 38

G1d	118	ASTKGPSVFPLA	SSKSTSGGTA	ALGCLVKDYFPE	PVTVSWNSGALT	SGVHTFPAVLQSS	GLYSLSSVTV	VPSSSLGT	QTYICNVN	NHKPS
G4d	118	ASTKGPSVFPLA	CSRSTSE	TAALGCLVKDYF	PEPVTVSWNSGALT	SGVHTFPAVLQSS	GLYSLSSVTV	VPSSSLGT	KTYICNVN	DHKPS
G1d	208	NTKVDK	KVEPKSCDK	KTHTCPPC	PAPPELLGGPSV	FLFPPKPKDTLMIS	RTPEVTCVVVDV	SHEDPEV	KFNWYVDG	VEVHNATKPREEQYN
G4d	208	NTKVDK	KRVESK---	YGPPC	PPCPAPEFLGGPSV	FLFPPKPKDTLMIS	RTPEVTCVVVDV	SHEDPEV	KFNWYVDG	VEVHNATKPREEQFN
G1d	298	STYRVVSVLT	VLHQDWLNG	KEYKCKVSNK	ALPAPIEKTISKAKG	QPREPQVYTLPPS	RDELTKNQVSLT	CLVKGFYPSD	IAVEWESNGQP	
G4d	298	STYRVVSVLT	VLHQDWLNG	KEYKCKVSNK	GLPSSIEKTISKAKG	QPREPQVYTLPPS	QEFMTKNQVSLT	CLVKGFYPSD	IAVEWESNGQP	
G1d	388	ENNYKTTPPV	LDSGSEFFLYS	KRLTVDKSRW	QGNVFSCSVMHEA	LHNHYTQKSLSL	SP	(SEQ ID NO: 80)		
G4d	388	ENNYKTTPPV	LDSGSEFFLYS	RRLTVDKSRW	QGNVFSCSVMHEA	LHNHYTQKSLSL	SL	(SEQ ID NO: 81)		

FIG. 39

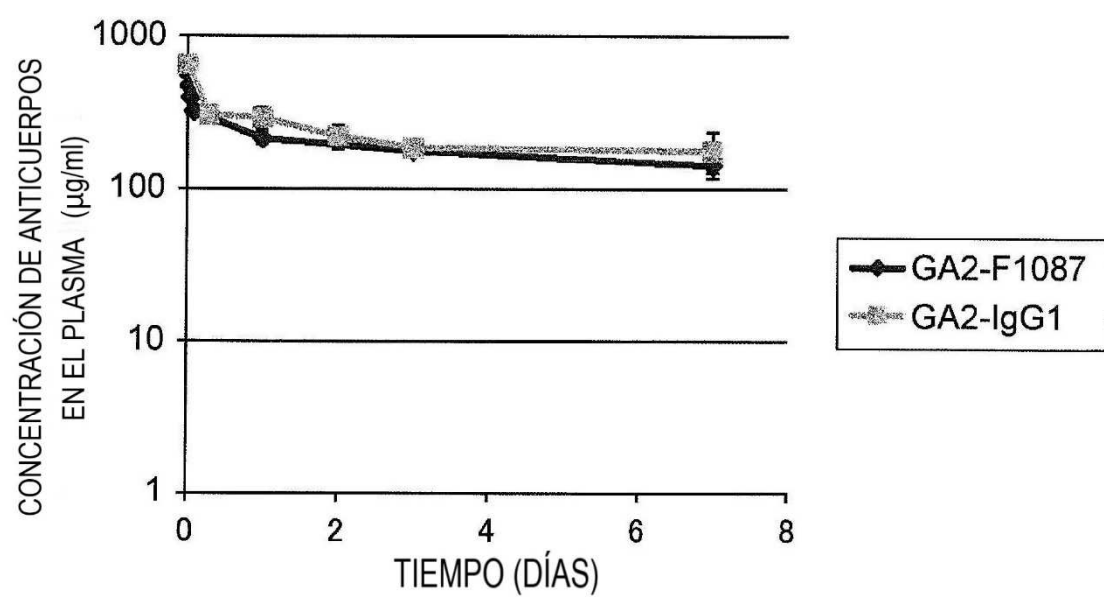


FIG. 40

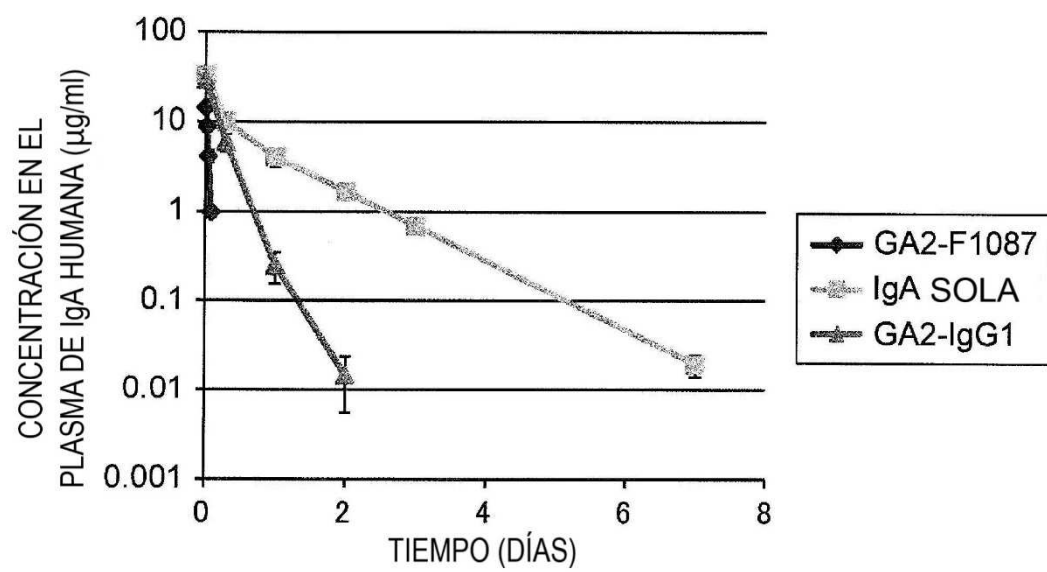


FIG. 41

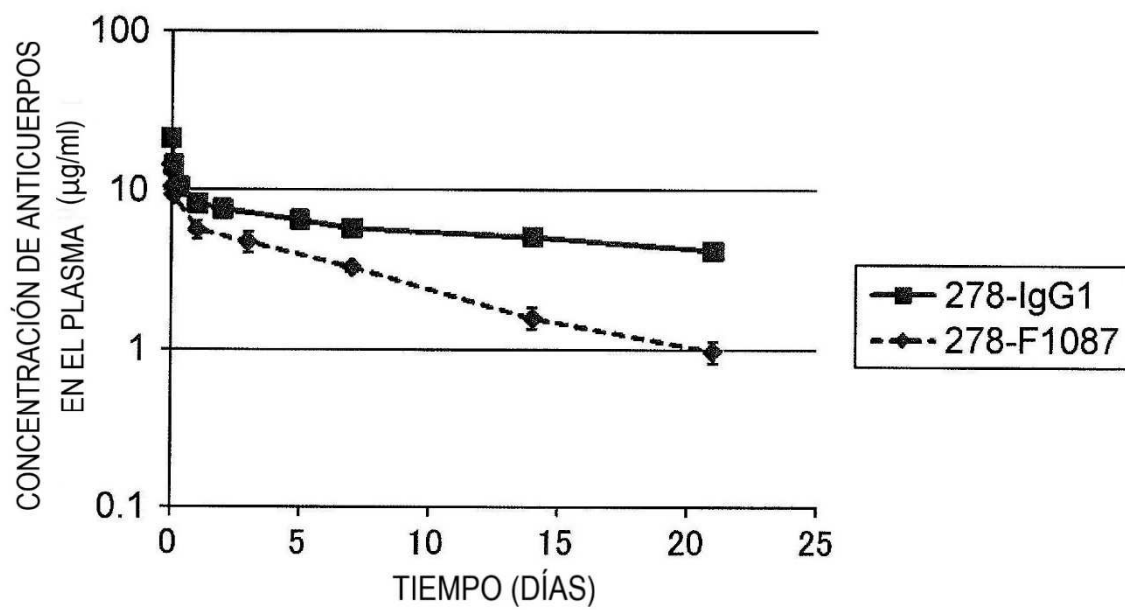


FIG. 42

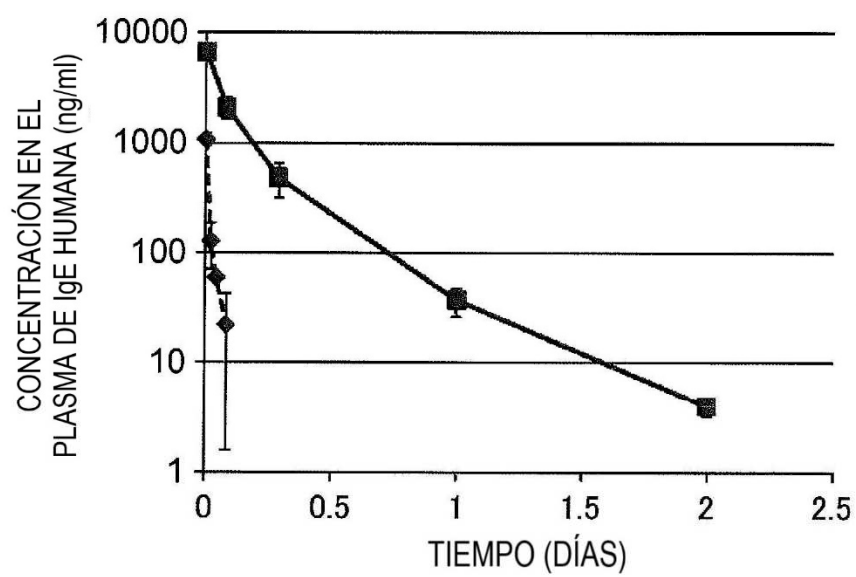


FIG. 43

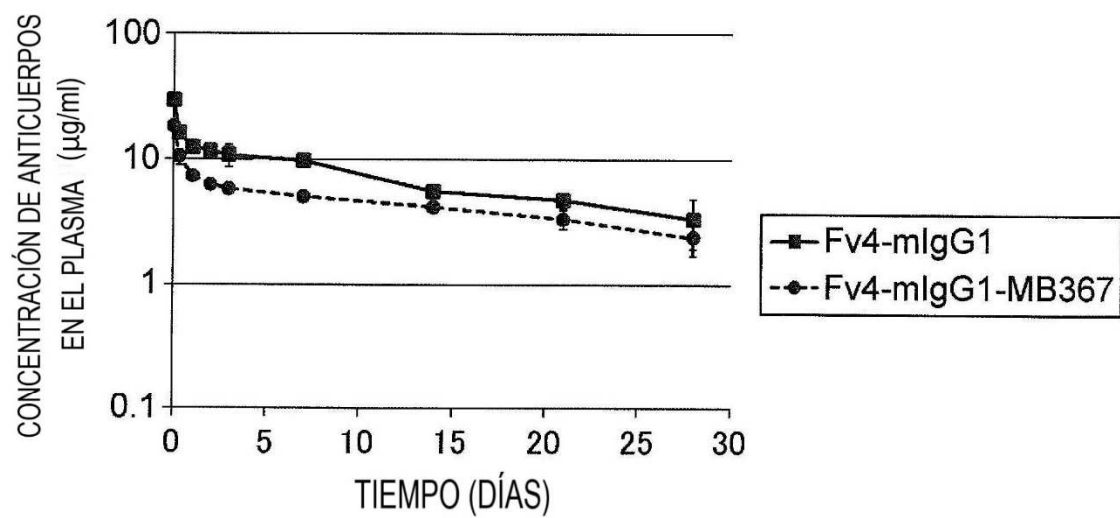


FIG. 44

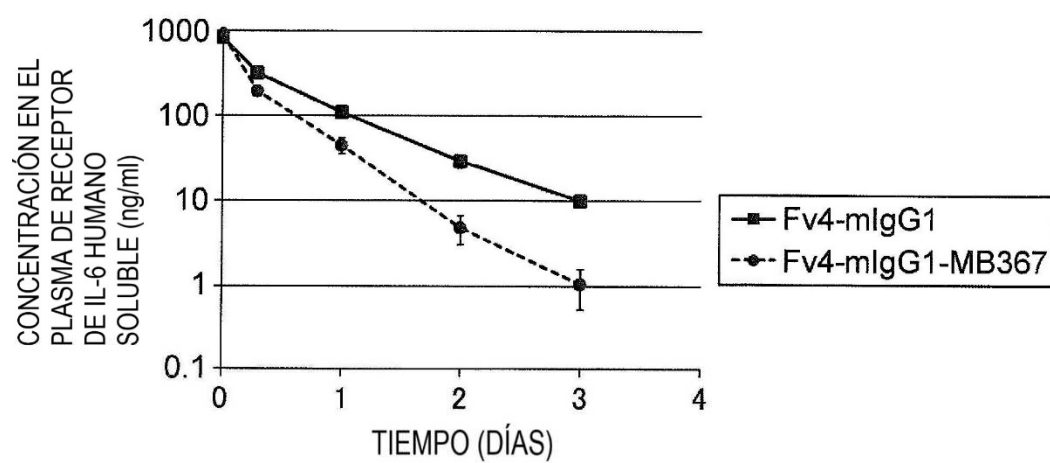


FIG. 45