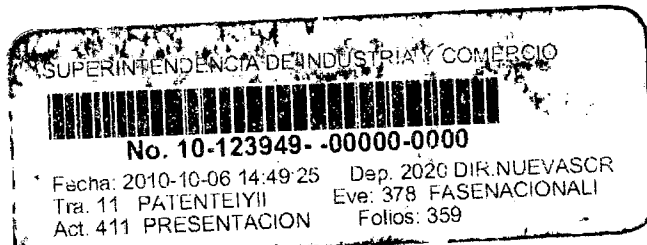


PGT

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

OK
R.C.F.



SOLICITU

PATENTE DE INVENCION

10-123949

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO MOLÉCULAS DE UNIÓN AL ANTÍGENO QUE SE UNEN REPETIDAMENTE A DOS O MAS MOLÉCULAS DE ANTÍGENO.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL CO7K 16/28

71. SOLICITANTE CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

DOMICILIO Kita-ku, Tokyo, Japón

74. APODERADO DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C. _____

11-2010



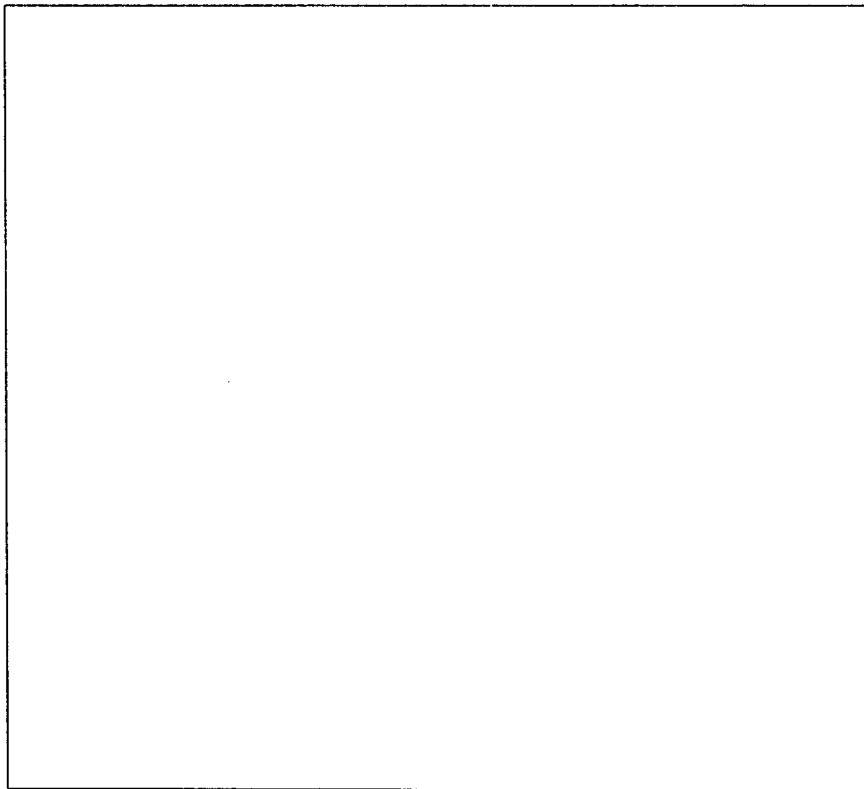
No. 10-123949-00000-0000

Fecha: 2010-10-06 14:49:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 359

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☒ Capítulo I.		☐ Capítulo II.	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA Dirección: 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115-8543 Japón. Nacionalidad o domicilio: Kita-ku, Tokyo, Japón. Lugar de Constitución: Japón Teléfono: Fax: E-mail:	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número	
3 REPRESENTANTE O APODERADO (74)	Nombre: DÍLIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6 Teléfono: 6 181088 Fax: 6350824 E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número 41.654.882 TP 20824 CSJ	
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: VER HOJA ANEXA Dirección: Nacionalidad o domicilio:		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/JP2009/057309</u> Fecha <u>10 de abril de 2009</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2009/125825 A1</u> Fecha <u>15 de octubre de 2009</u>			
6 TÍTULO (54) <u>MOLÉCULAS DE UNIÓN AL ANTÍGENO QUE SE UNEN REPETIDAMENTE A DOS O MAS MOLÉCULAS DE ANTÍGENO</u> (Folio 160)			
7 Clasificación Internacional (51) <u>CO7K 16/28</u>			
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>JAPÓN</u> <u>JAPÓN</u> <u>JAPÓN</u>	(32) Fecha <u>11 de abril de 2008</u> <u>26 de septiembre de 2008</u> <u>19 de marzo de 2009</u>	(31) Número de Solicitud <u>2008-104147</u> <u>2008-247713</u> <u>2009-068744</u>
9 Comprobante de pago No. 10-80.045 //10-80.060 //10-80.061 //10-63.310 //10-63.311 //10-63.312 10-63.313 Fecha 24/09/10 // 24/09/10 // 24/09/10 // 08/03/10 // 08/03/10 // 08/03/10 // 08/03/10			

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros Reporte de examen preliminar

11 FIGURA CARACTERÍSTICA**12 Solicito la concesión de la patente****NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN****FIRMA:****C.C. 41.654.882****T.P. 20824**

ANEXOS

INVENTORES

1.)

IGAWA, Tomoyuki

(135, Komakado 1-Chome, Gotenba-shi, Shizuoka 412-8513 Japon);

2.)

ISHII, Shinya

(135, Komakado 1-Chome, Gotenba-shi, Shizuoka 412-8513 Japon);

3.)

MAEDA, Atsuhiko

(135, Komakado 1-Chome, Gotenba-shi, Shizuoka 412-8513 Japon);

4.)

NAKAI, Takashi

(135, Komakado 1-Chome, Gotenba-shi, Shizuoka 412-8513 Japon);

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 80,045
FECHA : SEPTIEMBRE 24 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-123949- -00000-0000

Fecha: 2010-10-06 14:49:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 359

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353205366	24/09/2010	90,750,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

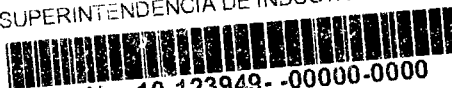
8-2691
3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 80,060
FECHA : SEPTIEMBRE 24 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-123949- -00000-0000

Fecha: 2010-10-06 14:49:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE Y II Eje: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 359

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353205366	24/09/2010	90,750,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
49		INSCRIPCION DE LICENCIAS Y DERECH	500,000.00
TOTAL :			\$ 500,000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

P2691
4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 80,061
FECHA : SEPTIEMBRE 24 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-123949- -00000-0000

Fecha: 2010-10-06 14:49:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 359

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	353205366	24/09/2010	90,750,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
49		INSCRIPCION DE LICENCIAS Y DERECH	500,000.00
		TOTAL :	\$ 500,000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 63,310

FECHA : AGOSTO 3 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-123949-00000-0000

Fecha: 2010-10-08 14:49:25

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 359

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	380476084	02/08/2010	94,210,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	10,000.00
	TOTAL :	\$ 10,000.00

SON: DIEZ MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 63,311
FECHA : AGOSTO 3 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-123949- -00000-0000

Fecha: 2010-10-06 14:49:25 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 359

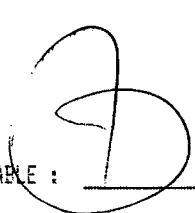
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	380476084	02/08/2010	94,210,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL : \$ 10,000.00

SON: DIEZ MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 63,312

FECHA : AGOSTO 3 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-123949- -00000-0000

Fecha: 2010-10-08 14:49:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 359

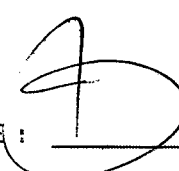
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	380476084	02/08/2010	94,210,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL : \$ 10,000.00

SON: DIEZ MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 63,313
FECHA : AGOSTO 3 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-123949- -00000-0000

Fecha: 2010-10-06 14:49:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 359

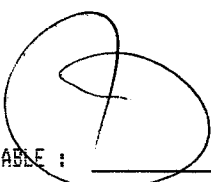
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	380476084	02/08/2010	94,210,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL : \$ 10,000.00

SON: DIEZ MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

COLOMBIA

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 · Fax: (57 1) 6350824 · Email: info@clarkemodet.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de
CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de
Japon

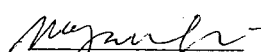
y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en **5-1. Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115-8543, Japón**

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de **DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN**, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y **CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ**, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los días de


Firma / signature

YAMAGUCHI, Masahisa

General Manager, Intellectual Property Department

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

legal representative(s) of
CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

an organization existing under the laws of
Japan

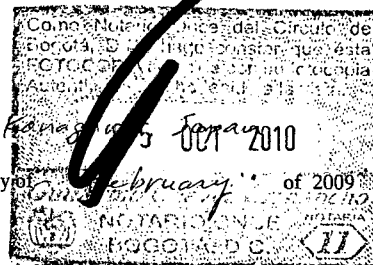
and in present execution of its business activity, domiciled **5-1. Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115-8543, Japan**

do hereby grant **POWER OF ATTORNEY** to **DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN**, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and **CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ**, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related objet and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Granted and signed at

on this 6th day of



February 10, 2009

認

証

囑託人中外製薬株式会社知的財産部長山口雅久の代理人弘藤瑞恵は、本公証人に対し、囑託人が別添文書に署名したことを自認している旨陳述した。



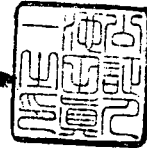
よって、これを認証する。

平成21年 3 月 10 日、本公証人役場において
東京都千代田区内幸町2丁目2番2号

東京法務局所属

公証人
Notary

池田真一
MAKAZU IKEDA



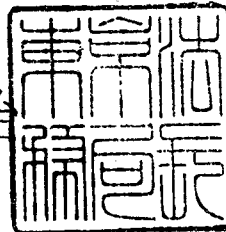
証 明

上記署名は、東京法務局所属公証人の署名に相違ないものであり、かつ、その押印は、真実のものであることを証明する。

平成21年 3 月 10 日

東京法務局長

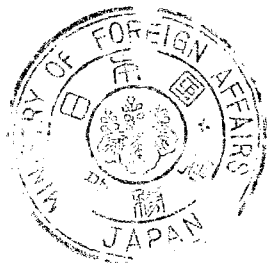
五十嵐義治



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

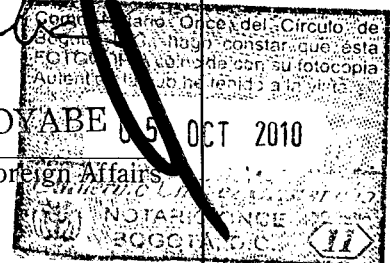
1. Country: JAPAN
This public document
2. has been signed by **MAKAZU IKEDA**
3. acting in the capacity of Notary of the Tokyo Legal Affairs Bureau
4. bears the seal/stamp of **MAKAZU IKEDA, NOTARY**
Certified
5. at Tokyo
6. **MAR 10 2009**
7. by the Ministry of Foreign Affairs
8. 09- NO 000148
9. Seal/stamp:
10. Signature



K. Oyabe

Kazutoyo OYABE 05 OCT 2010

For the Minister for Foreign Affairs



Traducción oficial hecha por Jimena Escobar Uribe, traductora e intérprete oficial según resolución No. 0369 del Ministerio de Justicia, del documento legalizado mediante la APOSTILLA No. 000148 de 10 de marzo de 2009 expedida en Japón, el cual corresponde a un documento de poder en inglés con su correspondiente traducción al español (razón por la cual no se hace traducción del mismo texto), otorgado por la sociedad CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, domiciliada en Tokio, Japón, firmado el 6 de febrero de 2009 por YAMAGUCHI, Masahisa, Director General del departamento de propiedad intelectual.

Registro No. 394 de 2009

Certificado Notarial

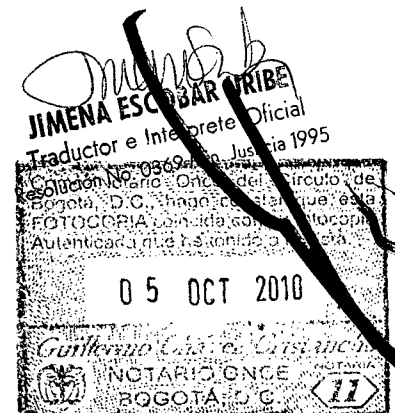
Yo, el suscrito NOTARIO, debidamente autorizado y practicante en TOKIO, JAPÓN, POR MEDIO DEL PRESENTE CERTIFICO QUE:

La firma que aparece al pie del Poder escrito es la firma genuina y auténtica del señor MASAHAISA YAMAGUCHI, director general del departamento de propiedad intelectual de CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, una sociedad existente y organizada bajo las leyes de Japón, quien ha producido suficiente prueba de su poder para ejecutar dicho instrumento a nombre de la mencionada sociedad.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he suscrito mi nombre y fijado el sello de mi oficina.

Fechado este día 10 de marzo de 2009.

Firmado: Masakazu Ikeda, Notario



Sello: Oficina de Asuntos Legales de Tokio
 No. 2-2-2, Uchisaiwaicho, Chiyoda-Ku, Tokio, Japón

APOSTILLA

(Convención de la Haya de 5 de octubre de 1961)

1. País: **JAPÓN**

Este documento público

2. Ha sido firmado por **Masakazu Ikeda**

3. Actuando en su calidad de **Notario de la Oficina de Asuntos Legales de Tokio**

4. Lleva el sello de **Masakazu Ikeda, Notario**

CERTIFICADO

5. En Tokio

6. Marzo 10 de 2009

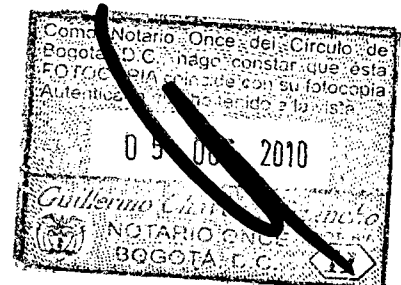
7. Por el Ministerio de Asuntos Exteriores

8. NO. 000149

9. Sello/Estampilla: Ministerio de Asuntos Exteriores, Japón

10. Firma (ilegible), Kazutoyo OYABE, Por el Ministro de Asuntos Exteriores

Jimena Escobar Uribe
JIMENA ESCOBAR URIBE
 Traductor e Intérprete Oficial
 Resolución No. 0369 Min. Justicia 1995



**MOLÉCULAS DE UNIÓN AL ANTÍGENO QUE SE UNEN REPETIDAMENTE A DOS O
MAS MOLÉCULAS DE ANTÍGENO**

RESUMEN

Los anticuerpos con una actividad de unión al antígeno más débil al pH endosómico temprano que al pH del plasma tienen la capacidad de unirse a múltiples moléculas de antígeno para una sola molécula de anticuerpo, tienen vidas medias prolongadas en plasma y disponen de más tiempo para unirse al antígeno.

MOLÉCULAS DE UNIÓN AL ANTÍGENO QUE SE UNEN REPETIDAMENTE A DOS O MAS MOLÉCULAS DE ANTÍGENO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona con métodos para mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno y métodos para incrementar la cantidad de veces que las moléculas de unión al antígeno se unen a un antígeno, y también con moléculas de unión al antígeno que tienen una farmacocinética mejorada, moléculas de unión al antígeno que se unen a un antígeno una mayor cantidad de veces, y métodos para producir estas moléculas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los anticuerpos están ganando atención como fármacos, ya que son muy estables en plasma y tienen pocos efectos adversos. En la actualidad, hay una cantidad de fármacos basados en anticuerpos del tipo de la IgG disponibles en el mercado, y muchos más fármacos basados en anticuerpos se hallan en desarrollo (Documentos que no pertenecen a la literatura de patentes 1 y 2). Mientras tanto, se han desarrollado diversas tecnologías que pueden aplicarse a fármacos basados en anticuerpos de segunda generación, incluyendo técnicas que permiten mejorar la función efectora, la capacidad de unión al antígeno, la farmacocinética y la estabilidad, y técnicas que permiten reducir el riesgo de inmunogenicidad (Documento que no pertenece a la literatura de patentes 3). En general, la dosis necesaria de un fármaco a base de anticuerpos es muy alta. Por consiguiente, esto ha resultado en problemas, tales como un costo de producción elevado, y también en la dificultad de producir formulaciones subcutáneas. En teoría, la dosis de un fármaco a base de anticuerpos puede reducirse mejorando la farmacocinética del anticuerpo o mejorando la afinidad entre los anticuerpos y los antígenos.

En la literatura se han descrito métodos para mejorar la farmacocinética de un anticuerpo usando una sustitución artificial de aminoácidos en las regiones constantes (Documentos que no pertenecen a la literatura de patentes 4 y 5). De manera similar, se ha mencionado la maduración por afinidad como una tecnología para mejorar la capacidad de unión al antígeno o la actividad de neutralización de antígenos

(Documento que no pertenece a la literatura de patentes 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 una porción similar. La mejora de la capacidad de unión al antígeno permite mejorar la actividad biológica *in vitro* o reducir la dosificación, y además, permite mejorar la eficacia *in vivo* (Documento que no pertenece a la literatura de patentes 7).

La capacidad de neutralización de antígenos de una sola molécula de anticuerpo depende de su afinidad. Al incrementar la afinidad, es posible neutralizar un antígeno con una menor cantidad de anticuerpo. Pueden usarse diversos métodos para mejorar la afinidad del anticuerpo. Además, si la afinidad pudiera incrementarse hasta el infinito mediante la unión covalente del anticuerpo al antígeno, una sola molécula de anticuerpo podría neutralizar una molécula de antígeno (un anticuerpo divalente podría neutralizar dos moléculas de antígeno). Sin embargo, la neutralización estequiométrica de un anticuerpo contra un antígeno (un anticuerpo divalente contra dos antígenos) es el límite de los métodos preexistentes, por lo que es imposible neutralizar completamente un antígeno con una menor cantidad de anticuerpo que la cantidad de antígeno. En otras palabras, el efecto de mejora de la afinidad tiene un límite (Documento que no pertenece a la literatura de patentes 9). Para prolongar el efecto de neutralización de un anticuerpo neutralizador durante un período determinado, es necesario administrar el anticuerpo en una dosis mayor que la cantidad de antígeno producido en el cuerpo durante el mismo período. Por lo tanto, con la mejora de la farmacocinética del anticuerpo o la tecnología de maduración por afinidad por sí solas, como se describe en la presente documentación, hay un límite para la reducción de la dosis de anticuerpo necesaria.

Por ende, con el fin de mantener el efecto de neutralización de antígenos de un anticuerpo por un período deseado, con una menor cantidad de anticuerpo que la cantidad de antígeno, es necesario que un solo anticuerpo pueda neutralizar varios antígenos. Los métodos para neutralizar múltiples antígenos con un solo anticuerpo incluyen la inactivación del antígeno con anticuerpos catalíticos, que son anticuerpos que poseen una función catalítica. Cuando el antígeno es una proteína, es posible inactivarlo hidrolizando sus enlaces peptídicos. Un anticuerpo puede neutralizar repetidamente antígenos al catalizar dicha hidrólisis (Documento que no pertenece a la

literatura de patentes 8). Los anticuerpos catalíticos y las tecnologías para producirlos han sido descriptos en diversas publicaciones. Sin embargo, no se han descripto anticuerpos catalíticos que tengan una actividad catalítica suficiente para usarlos como agentes farmacéuticos. Específicamente, en un estudio con anticuerpos contra un antígeno determinado *in vivo*, no se han descripto anticuerpos catalíticos que puedan producir un efecto comparable o más fuerte, aún en dosis bajas, o que puedan producir un efecto más prolongado, aún en la misma dosis que un anticuerpo neutralizador no catalítico convencional.

Como se describió con anterioridad, no se han descripto anticuerpos que puedan producir un efecto *in vivo* superior que el de los anticuerpos neutralizadores convencionales mediante la neutralización de múltiples moléculas de antígeno con un solo anticuerpo. Por consiguiente, desde el punto de vista de la reducción de la dosis y la prolongación de la durabilidad, existe la necesidad de nuevas tecnologías que permitan producir nuevas moléculas de anticuerpos que posean un efecto *in vivo* más fuerte que el de los anticuerpos neutralizadores convencionales, mediante la neutralización individual de múltiples moléculas de antígeno.

A continuación se detallan los documentos que constituyen los antecedentes técnicos de la presente invención.

[Documentos de los antecedentes técnicos]

[Documentos que no pertenecen a la literatura de patentes]

Documento que no pertenece a la literatura de patentes 1: Monoclonal antibody successes in the clinic. Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Nature Biotechnology 23, 1073-1078 (2005)

Documento que no pertenece a la literatura de patentes 2: Pavlou AK, Belsey MJ. The therapeutic antibodies market to 2008. Eur J Pharm Biopharm. Abril de 2005;59(3):389-96

Documento que no pertenece a la literatura de patentes 3: Kim SJ, Park Y, Hong HJ. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. Mol Cells. 31 de Agosto de 2005;20(1):17-29. Revisión

Documento que no pertenece a la literatura de patentes 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. 1º de Enero de 2006;176(1):346-56

Documento que no pertenece a la literatura de patentes 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. Julio de 1997;15(7):637-40

Documento que no pertenece a la literatura de patentes 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. 14 de Junio de 2005;102(24):8466-71. Epub 6 de Junio de 2005

Documento que no pertenece a la literatura de patentes 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 que no pertenece a la literatura de patentes 8: Hanson CV, Nishiyama Y, Paul S. Catalytic antibodies and their applications. Curr Opin Biotechnol. Diciembre de 2005;16(6):631-6

Documento que no pertenece a la literatura de patentes 9: Rathanaswami P, Roalstad S, Roskos L, Su QJ, Lackie S, Babcook J. Demonstration of an in vivo generated sub-picomolar affinity fully human monoclonal antibody to interleukin-8. Biochem Biophys Res Commun. 9 de Septiembre de 2005;334(4):1004-13

RESUMEN DE LA INVENCION

Las circunstancias mencionadas con anterioridad resultaron en los descubrimientos de la presente invención. Por ende, un objetivo de la presente invención es proveer métodos para unir moléculas de unión al antígeno varias veces a los antígenos, y métodos para mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno, y también moléculas de unión al antígeno que son capaces de unirse a los antígenos varias veces, moléculas de unión al antígeno que tienen una farmacocinética mejorada, composiciones farmacéuticas que contienen dichas moléculas de unión al antígeno, y métodos para producir dichas moléculas y composiciones.

En la presente documentación, se describen estudios dedicados relacionados con métodos para unir polipéptidos que presentan capacidad de unión al antígeno, tales como moléculas de unión al antígeno, varias veces a los antígenos, y métodos para mejorar las vidas medias de dichas moléculas en plasma (sangre) (mediante la mejora de su farmacocinética). Como resultado, se descubrió que, si la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno al pH endosómico temprano es inferior a su actividad de unión al antígeno al pH del plasma (sangre), debería ser capaz de unirse varias veces a los antígenos y tendría una vida media en plasma más prolongada.

Por lo tanto, la presente invención se relaciona con métodos para unir moléculas de unión al antígeno varias veces a los antígenos, métodos para mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno, y métodos para producir moléculas de unión al antígeno con una farmacocinética mejorada. La presente invención también se relaciona con moléculas de unión al antígeno que son capaces de unirse varias veces a los antígenos y moléculas de unión al antígeno que tienen una farmacocinética mejorada. Más específicamente, en la presente invención se provee

[1] una molécula de unión al antígeno que tiene un valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$, definido como la relación entre la KD del antígeno a pH 5,8 y la KD del antígeno a pH 7,4, de 2 o más;

[2] la molécula de unión al antígeno de [1], donde el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ es de 10 o más;

[3] la molécula de unión al antígeno de [1], donde el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ es de 40 o más;

[4] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de [1] a [3], donde al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno ha sido sustituido por histidina, o se ha insertado al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno;

[5] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de [1] a [4], donde la molécula de unión al antígeno tiene actividad antagónica;

[6]. la molécula de unión al antígeno de cualquiera de [1] a [5], donde la molécula de unión al antígeno se une a un antígeno de membrana o un antígeno soluble;

[7] la molécula de unión al antígeno de cualquiera de [1] a [6], donde la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo;

- [8] una composición farmacéutica que comprende la molécula de unión al antígeno de cualquiera de [1] a [7];
- [9] un método para mejorar la farmacocinética de una molécula de unión al antígeno, que comprende reducir la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 5,8, en comparación con la actividad a pH 7,4;
- [10] un método para incrementar la cantidad de veces que se une a los antígenos una molécula de unión al antígeno, que comprende reducir la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 5,8, en comparación con la actividad a pH 7,4;
- [11] un método para incrementar la cantidad de antígenos a los que puede unirse una molécula de unión al antígeno, que comprende reducir la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 5,8, en comparación con la actividad a pH 7,4;
- [12] un método para disociar, dentro de una célula, un antígeno de una molécula de unión al antígeno que se unió desde el exterior de la célula, que comprende reducir la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 5,8, en comparación con la actividad a pH 7,4;
- [13] un método para liberar de la célula una molécula de unión al antígeno que ha estado unida a un antígeno y ha sido internalizada en una célula, en una forma libre de antígeno, que comprende reducir la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 5,8, en comparación con la actividad a pH 7,4;
- [14] un método para incrementar la capacidad de una molécula de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma, que comprende reducir la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 5,8, en comparación con la actividad a pH 7,4;
- [15] el método de cualquiera de [9] a [14], donde el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$, definido como la relación entre la KD del antígeno a pH 5,8 y la KD del antígeno a pH 7,4, es de 2 o más;
- [16] el método de cualquiera de [9] a [14], donde el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ es de 10 o más;
- [17] el método de cualquiera de [9] a [14], donde el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ es de 40 o más;

[18] un método para mejorar la farmacocinética de una molécula de unión al antígeno, que comprende sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno por histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno;

[19] un método para incrementar la cantidad de veces que se une a los antígenos una molécula de unión al antígeno, que comprende sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno por histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno;

[20] un método para incrementar la cantidad de antígenos a los que puede unirse una molécula de unión al antígeno, que comprende sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno por histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno;

[21] un método para disociar, dentro de una célula, un antígeno de una molécula de unión al antígeno que se unió desde el exterior de la célula, que comprende sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno por histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno;

[22] un método para liberar de la célula una molécula de unión al antígeno que ha estado unida a un antígeno y ha sido internalizada en una célula, en una forma libre de antígeno, que comprende sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno por histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno;

[23] un método para incrementar la capacidad de una molécula de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma, que comprende sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno por histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno;

[24] el método de cualquiera de [18] a [23], donde la sustitución por histidina o la inserción de histidina incrementan el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$, definido como la relación entre la actividad de unión al antígeno a pH 5,8 y la actividad de unión al antígeno a pH 7,4, en comparación con el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ antes de la sustitución por histidina o la inserción de histidina;

[25] el método de cualquiera de [9] a [24], donde la molécula de unión al antígeno tiene actividad antagónica;

[26] el método de cualquiera de [9] a [25], donde la molécula de unión al antígeno se une a un antígeno de membrana o un antígeno soluble;

[27] el método de cualquiera de [9] a [26], donde la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo;

[28] un método para buscar una molécula de unión al antígeno que comprende los siguientes pasos:

(a) determinar la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a un pH de entre 6,7 y 10,0;

(b) determinar la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a un pH de entre 4,0 y 6,5; y

(c) seleccionar una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a un pH de entre 6,7 y 10,0 es mayor que su actividad de unión al antígeno a un pH de entre 4,0 y 6,5;

[29] el método de búsqueda de [28], que comprende el paso de seleccionar un anticuerpo cuya actividad de unión al antígeno a un pH de entre 6,7 y 10,0 es el doble o más de la actividad de unión al antígeno a un pH de entre 4,0 y 6,5;

[30] un método para buscar una molécula de unión al antígeno que comprende los siguientes pasos:

(a) unir una molécula de unión al antígeno a un antígeno bajo una condición con un pH de entre 6,7 y 10,0;

(b) colocar la molécula de unión al antígeno unida al antígeno de (a) bajo una condición con un pH de entre 4,0 y 6,5; y

(c) obtener una molécula de unión al antígeno disociada bajo una condición con un pH de entre 4,0 y 6,5;

[31] un método para buscar una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH es mayor que a un segundo pH, que comprende los siguientes pasos:

(a) unir una molécula de unión al antígeno a una columna con un antígeno inmovilizado bajo una condición con el primer pH;

(b) eluir la molécula de unión al antígeno unida a la columna al primer pH de la columna, bajo una condición con el segundo pH; y

(c) recolectar la molécula de unión al antígeno eluida;

[32] un método para buscar una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH es mayor que a un segundo pH, que comprende los siguientes pasos:

- (a) unir una biblioteca de moléculas de unión al antígeno a una columna con un antígeno inmovilizado bajo una condición con el primer pH;
- (b) eluir la molécula de unión al antígeno de la columna bajo una condición con el segundo pH;
- (c) amplificar el gen que codifica la molécula de unión al antígeno eluida; y
- (d) obtener la molécula de unión al antígeno eluida.

[33] el método de búsqueda de [31] o [32], donde el primer pH es de entre 6,7 y 10,0, y el segundo pH es de entre 4,0 y 6,5;

[34] el método de búsqueda de cualquiera de [28] a [33], donde al menos uno o más aminoácidos de la molécula de unión al antígeno han sido sustituidos por histidina, o se ha insertado al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno;

[35] el método de búsqueda de cualquiera de [28] a [33], para obtener una molécula de unión al antígeno que es superior en términos de retención en plasma;

[36] el método de búsqueda de cualquiera de [28] a [33], para obtener una molécula de unión al antígeno que es capaz de unirse a un antígeno dos o más veces;

[37] el método de búsqueda de cualquiera de [28] a [33], para obtener una molécula de unión al antígeno que es capaz de unirse a más antígenos, en comparación con la cantidad de sitios de unión al antígeno que posee;

[38] el método de búsqueda de cualquiera de [28] a [33], para obtener una molécula de unión al antígeno que se disocia, dentro de una célula, de un antígeno unido desde el exterior de la célula.

[39] el método de búsqueda de cualquiera de [28] a [33], para obtener una molécula de unión al antígeno que está unida a un antígeno y ha sido internalizada en una célula, y que luego ha sido liberada de la célula en una forma libre de antígeno;

[40] el método de búsqueda de cualquiera de [28] a [33], para obtener una molécula de unión al antígeno que presenta una capacidad mejorada de eliminar antígenos en plasma;

[41] el método de búsqueda de cualquiera de [28] a [40], donde la molécula de unión al antígeno está formulada como una composición farmacéutica;

[42] el método de búsqueda de cualquiera de [28] a [41], donde la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo;

[43] un método para producir una molécula de unión al antígeno que comprende los siguientes pasos:

(a) determinar la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a un pH de entre 6,7 y 10,0;

(b) determinar la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a un pH de entre 4,0 y 6,5;

(c) seleccionar la molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a un pH de entre 6,7 y 10,0 es mayor que a un pH de entre 4,0 y 6,5;

(d) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno seleccionada en (c); y

(e) producir la molécula de unión al antígeno usando el gen obtenido en (d);

[44] un método para producir una molécula de unión al antígeno que comprende los siguientes pasos:

(a) unir una molécula de unión al antígeno a un antígeno bajo una condición con un pH de entre 6,7 y 10,0;

(b) permitir que la molécula de unión al antígeno unida al antígeno de (a) repose bajo una condición con un pH de entre 4,0 y 6,5;

(c) recolectar la molécula de unión al antígeno disociada bajo una condición con un pH de entre 4,0 y 6,5;

(d) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno obtenida en (c); y

(e) producir la molécula de unión al antígeno usando el gen obtenido en (d);

[45] un método para producir una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH es mayor que a un segundo pH, que comprende los siguientes pasos:

(a) unir una molécula de unión al antígeno a una columna con un antígeno inmovilizado bajo una condición con un primer pH;

(b) eluir de la columna la molécula de unión al antígeno, que se había unido a la columna al primer pH, bajo una condición con un segundo pH;

(c) recolectar la molécula de unión al antígeno eluida;

(d) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno obtenida en (c); y

(e) producir la molécula de unión al antígeno usando el gen obtenido en (d);

[46] un método para producir una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH es mayor que a un segundo pH, que comprende los siguientes pasos:

(a) unir una biblioteca de moléculas de unión al antígeno a una columna con un antígeno inmovilizado bajo una condición con un primer pH;

(b) eluir la molécula de unión al antígeno de la columna bajo una condición con un segundo pH;

(c) amplificar el gen que codifica la molécula de unión al antígeno eluida;

(d) recolectar la molécula de unión al antígeno eluida;

(e) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno recolectada en (d); y

(f) producir la molécula de unión al antígeno usando el gen obtenido en (e);

[47] el método de producción de [45] o [46], donde el primer pH es de entre 6,7 y 10,0, y el segundo pH es de entre 4,0 y 6,5.

[48] el método de producción de cualquiera de [43] a [47], que comprende además el paso de sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno por histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno;

[49] el método de producción de cualquiera de [43] a [47], donde la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo;

[50] una composición farmacéutica que comprende una molécula de unión al antígeno producida con el método de producción de cualquiera de [43] a [49].

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es un diagrama donde se ilustra la vía de degradación de los anticuerpos unidos a antígenos unidos a la membrana.

La FIG. 2 es un diagrama donde se ilustra un mecanismo mediante el cual las moléculas de IgG son capturadas por FcRn.

La FIG. 3 es un diagrama esquemático donde se ilustra la unión de las moléculas de IgG con nuevos antígenos, después de la disociación de los antígenos unidos a la membrana en los endosomas.

La FIG. 4 es un diagrama esquemático donde se ilustra la unión de moléculas de IgG con un nuevo antígeno, después de la disociación de un antígeno soluble en los endosomas.

La FIG. 5 es un diagrama donde se ilustra el proceso de búsqueda con el uso de una columna de antígenos inmovilizados.

En la FIG. 6 se presentan gráficos donde se ilustran los resultados de un ELISA de fagos para clones adquiridos por medio de una búsqueda en columna. En el gráfico superior se ilustra un espécimen tipo salvaje (WT), y en el gráfico inferior se ilustra CL5.

La FIG. 7 es un gráfico donde se ilustra la actividad de neutralización biológica de anticuerpos anti-receptor de IL-6 cuya unión depende del pH.

En la FIG. 8 se presentan gráficos donde se ilustran los resultados de un sensograma Biacore para la unión de anticuerpos anti-receptor de IL-6, cuya unión depende del pH, con el receptor de IL-6 soluble a pH 7,4. En el gráfico superior se ilustra un espécimen WT; en el segundo gráfico desde arriba se ilustra H3pl/L73; en el tercer gráfico desde arriba se ilustra H170/L82; y en el gráfico inferior se ilustra CLH5/L73.

En la FIG. 9 se presentan gráficos donde se ilustran los resultados de un sensograma Biacore para la unión de anticuerpos anti-receptor de IL-6, cuya unión depende del pH, con el receptor de IL-6 soluble a pH 5,8. En el gráfico superior se ilustra un espécimen WT; en el segundo gráfico desde arriba se ilustra H3pl/L73; en el tercer gráfico desde arriba se ilustra H170/L82; y en el gráfico inferior se ilustra CLH5/L73.

FIG. 10 se presentan gráficos donde se ilustran los resultados de un sensograma Biacore para la asociación (pH 7,4) y la disociación (pH 5,8) de anticuerpos anti-receptor de IL-6, cuya unión depende del pH, a un receptor de IL-6 unido a la membrana. En el gráfico superior se ilustra un espécimen WT; en el segundo gráfico desde arriba se ilustra H3pl/L73; en el tercer gráfico desde arriba se ilustra H170/L82; y en el gráfico inferior se ilustra CLH5/L73.

La FIG. 11 es un sensograma Biacore donde se indica la unión repetida de anticuerpos anti-receptor de IL-6, cuya unión depende del pH, a SR344.

La FIG. 12 es un gráfico donde se ilustra la cantidad total de antígeno unido en un experimento de unión repetitiva de anticuerpos anti-receptor de IL-6, cuya unión depende del pH, a SR344.

La FIG. 13 es un gráfico donde se ilustra la progresión en el tiempo de la concentración de anticuerpos anti-receptor de IL-6, cuya unión depende del pH, en plasma de ratones transgénicos para el receptor de IL-6 humano.

La FIG. 14 es un gráfico donde se ilustra la progresión en el tiempo de la concentración de anticuerpos anti-receptor de IL-6, cuya unión depende del pH, en plasma de monos macacos.

La FIG. 15 es un gráfico donde se ilustra la progresión en el tiempo de la concentración de CRP en monos macacos, con relación a anticuerpos anti-receptor de IL-6 cuya unión depende del pH.

La FIG. 16 es un gráfico donde se ilustra la progresión en el tiempo de la concentración del receptor de IL-6 de mono macaco no unido en monos macacos, con relación a anticuerpos anti-receptor de IL-6 cuya unión depende del pH.

En la FIG. 17 se presentan gráficos donde se ilustran los resultados de un sensograma Biacore de asociación (pH 7,4) y disociación (pH 5,8) de anticuerpos anti-receptor de IL-6, cuya unión depende del pH, con un receptor de IL-6 unido a la membrana. Desde arriba hacia abajo, se ilustran los resultados para un espécimen WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1.

La FIG. 18 es un gráfico donde se ilustra la progresión en el tiempo de la concentración de anticuerpos anti-receptor de IL-6, cuya unión depende del pH, en plasma de ratones transgénicos para el receptor de IL-6 humano. Se presentan datos para un espécimen WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1.

En la FIG. 19 se presentan gráficos donde se ilustran los resultados de un sensograma Biacore para la asociación (pH 7,4) y la disociación (pH 5,8) de anticuerpos anti-receptor de IL-6, cuya unión depende del pH, a un receptor de IL-6 unido a la membrana. Desde arriba hacia abajo, se ilustran los resultados para un espécimen WT, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2 y Fv4-M58.

La FIG. 20 es un gráfico donde se ilustra la progresión en el tiempo de la concentración de anticuerpos anti-receptor de IL-6, cuya unión depende del pH, en plasma de ratones transgénicos para el receptor de IL-6 humano. Se presentan los datos para un espécimen WT, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2 y Fv4-M58.

En la FIG. 21 se presentan gráficos donde se ilustran los resultados de un sensograma Biacore de asociación (pH 7,4) y disociación (pH 5,8) de anticuerpos anti-receptor de IL-6, cuya unión depende del pH, a un receptor de IL-6 unido a la membrana. Desde arriba hacia abajo, se ilustran los resultados para un espécimen Fv1-M71, Fv1-M73, Fv3-M71 y Fv3-M73.

La FIG. 22 es un gráfico donde se ilustra la progresión en el tiempo de concentraciones de anticuerpos anti-receptor de IL-6, cuya unión depende del pH, en plasma de monos macacos, durante la administración de H3pl/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73 y Fv4-M73 a razón de 0,5 mg/kg, y durante la administración de un anticuerpo de alta afinidad a razón de 1,0 mg/kg. La FIG. 23 es un gráfico donde se ilustra la progresión en el tiempo de la concentración de CRP en monos macacos, con relación a anticuerpos anti-receptor de IL-6 cuya unión depende del pH. Se presentan los datos para grupos donde se administró H3pl/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73, Fv4-M73 y un anticuerpo de alta afinidad.

La FIG. 24 es un gráfico donde se ilustra la progresión en el tiempo de la concentración del receptor de IL-6 de mono macaco no unido en monos macacos, con relación a anticuerpos anti-receptor de IL-6 cuya unión depende del pH. Se presentan los datos para grupos donde se administró H3pl/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73, Fv4-M73 y un anticuerpo de alta afinidad.

La FIG. 25 es un diagrama donde se ilustra FR1, FR2, FR3 y FR4, junto con CDR1, CDR2 y CDR3 de las cadenas pesadas (VH1, VH2, VH3, VH4) y las cadenas livianas (VL1, VL2, VL3). Con asteriscos se señalan las localizaciones donde hay mutaciones de aminoácidos en las secuencias alineadas.

En la FIG. 26 se presenta un sensograma Biacore donde se ilustra la unión dependiente del pH de un anticuerpo anti-IL-6, Anti-IL6 clon 2, con IL-6, a pH 7,4 y pH 5,5. Las curvas en el sensograma a pH 7,4 corresponden a 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 ng/ml de IL-6, desde la parte superior.

En la FIG. 27 se presenta un sensograma Biacore donde se ilustra la unión dependiente del pH de un anticuerpo anti-receptor de IL-31, Anti-IL31R clon 1, con el receptor de IL-31 a pH 7,4 y pH 5,5. Las curvas en el sensograma a pH 5,5 corresponden a 100, 50, 25 y 12,5 ng/ml del receptor de IL-31, desde la parte superior.

En la FIG. 28 se ilustra la progresión en el tiempo de la concentración de un anticuerpo en plasma después de la administración intravenosa en ratones de una solución mixta que contiene SR344 y un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano.

En la FIG. 29 se ilustra la progresión en el tiempo de la concentración de SR344 en plasma después de la administración intravenosa en ratones de una solución mixta que contiene SR344 y un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En la presente invención se proveen métodos para preparar moléculas de unión al antígeno individuales que pueden unirse repetidamente a múltiples moléculas de antígeno. Cuando una molécula de unión al antígeno se une a múltiples moléculas de antígeno, es posible mejorar la farmacocinética de la molécula de unión al antígeno, y esta molécula puede ejercer efectos *in vivo* superiores que los que presentan las moléculas de unión al antígeno convencionales.

En la presente invención se proveen métodos para incrementar la cantidad de veces que se unen a los antígenos las moléculas de unión al antígeno. Más específicamente, en la presente invención se proveen métodos para incrementar la cantidad de veces que se unen a los antígenos las moléculas de unión al antígeno, que comprenden reducir la capacidad de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno a pH ácido, en comparación con la actividad a pH neutro. Además, en la presente invención se proveen métodos para incrementar la cantidad de veces que se unen a los antígenos las moléculas de unión al antígeno, que comprenden sustituir al menos un aminoácido en las moléculas de unión al antígeno por histidina, o insertar al menos una histidina en las moléculas de unión al antígeno. Además, en la presente invención se proveen métodos para incrementar la cantidad de veces que se unen a los antígenos las moléculas de unión al antígeno, que comprenden sustituir, suprimir, agregar y/o insertar aminoácidos en la región constante de anticuerpo de las moléculas de unión al antígeno.

En la presente invención también se proveen métodos para incrementar la cantidad de antígenos a los que puede unirse una molécula de unión al antígeno. Más específicamente, en la presente invención se proveen métodos para incrementar la cantidad de antígenos a los que puede unirse una molécula de unión al antígeno, que

comprenden reducir la capacidad de unión al antígeno a pH ácido, en comparación con la actividad a pH neutro. Además, en la presente invención se proveen métodos para incrementar la cantidad de antígenos a los que puede unirse una molécula de unión al antígeno, que comprenden sustituir al menos un aminoácido por histidina en las moléculas de unión al antígeno o insertar al menos una histidina en las moléculas de unión al antígeno. Además, en la presente invención se proveen métodos para incrementar la cantidad de antígenos a los que puede unirse una molécula de unión al antígeno, que comprenden sustituir, suprimir, agregar y/o insertar aminoácidos en la región constante de anticuerpo de las moléculas de unión al antígeno.

En la presente invención también se proveen métodos para disociar, dentro de una célula, un antígeno de una molécula de unión al antígeno que se unió desde el exterior de la célula. Más específicamente, en la presente invención se proveen métodos para disociar, dentro de una célula, un antígeno de una molécula de unión al antígeno que se unió desde el exterior de la célula, que comprenden reducir la capacidad de unión al antígeno a pH ácido, en comparación con la actividad a pH neutro. Además, en la presente invención se proveen métodos para disociar, dentro de una célula, un antígeno de una molécula de unión al antígeno que se unió desde el exterior de la célula, que comprenden sustituir al menos un aminoácido por histidina en la molécula de unión al antígeno o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno. Además, en la presente invención se proveen métodos para disociar, dentro de una célula, un antígeno de una molécula de unión al antígeno que se unió desde el exterior de la célula, que comprenden sustituir, suprimir, agregar y/o insertar aminoácidos en la región constante de anticuerpo de la molécula de unión al antígeno.

En la presente invención también se proveen métodos para liberar de la célula una molécula de unión al antígeno que ha estado unida a un antígeno y ha sido internalizada en una célula, en una forma libre de antígeno. Más específicamente, en la presente invención se proveen métodos para liberar de la célula una molécula de unión al antígeno que ha estado unida a un antígeno y ha sido internalizada en una célula, en una forma libre de antígeno, que comprenden reducir la capacidad de unión al antígeno a pH ácido, en comparación con la actividad a pH neutro. Además, en la presente invención se proveen métodos para liberar de la célula una molécula de unión al

antígeno que ha estado unida a un antígeno y ha sido internalizada en una célula, en una forma libre de antígeno, que comprenden sustituir al menos un aminoácido por histidina en la molécula de unión al antígeno o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno. Además, en la presente invención se proveen métodos para liberar de la célula una molécula de unión al antígeno que ha estado unida a un antígeno y ha sido internalizada en una célula, en una forma libre de antígeno, que comprenden sustituir, suprimir, agregar y/o insertar aminoácidos en la región constante de anticuerpo de la molécula de unión al antígeno.

En la presente invención también se proveen métodos para incrementar la capacidad de una molécula de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma. Más específicamente, en la presente invención se proveen métodos para incrementar la capacidad de una molécula de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma, que comprenden reducir la capacidad de unión al antígeno a pH ácido, en comparación con la actividad a pH neutro. Además, en la presente invención se proveen métodos para incrementar la capacidad de una molécula de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma, que comprenden sustituir al menos un aminoácido por histidina en las moléculas de unión al antígeno o insertar al menos una histidina en las moléculas de unión al antígeno. Además, en la presente invención se proveen métodos para incrementar la capacidad de una molécula de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma, que comprenden sustituir, suprimir, agregar y/o insertar aminoácidos en la región constante de anticuerpo de la molécula de unión al antígeno.

En la presente invención también se proveen métodos para mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno. Más específicamente, en la presente invención se proveen métodos para mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno (al prolongar la retención en plasma), que comprenden reducir la capacidad de unión al antígeno a pH ácido, en comparación con la actividad a pH neutro. Además, en la presente invención se proveen métodos para mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno, que comprenden sustituir al menos un aminoácido por histidina en las moléculas de unión al antígeno o insertar al menos una histidina en las moléculas de unión al antígeno. Además, en la presente invención se proveen métodos para mejorar la farmacocinética de las moléculas de

unión al antígeno, que comprenden sustituir, suprimir, agregar y/o insertar aminoácidos en la región constante de anticuerpo de las moléculas de unión al antígeno.

Además, en la presente invención se proveen métodos para incrementar la capacidad de las moléculas de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma. Más específicamente, en la presente invención se proveen métodos para incrementar la capacidad de las moléculas de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma, que comprenden reducir la capacidad de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno a pH ácido, en comparación con la actividad a pH neutro. Además, en la presente invención se proveen métodos para incrementar la capacidad de las moléculas de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma, que comprenden sustituir al menos un aminoácido en las moléculas de unión al antígeno por histidina o insertar al menos una histidina en las moléculas de unión al antígeno. Además, en la presente invención se proveen métodos para incrementar la capacidad de las moléculas de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma, que comprenden sustituir, suprimir, agregar y/o insertar aminoácidos en la región constante de anticuerpo de las moléculas de unión al antígeno.

En la presente documentación, la "potenciación de la farmacocinética", la "mejora de la farmacocinética" y la "farmacocinética superior" son frases que pueden usarse indistintamente con la "potenciación de la retención en plasma (sangre)", la "mejora de la retención en plasma (sangre)" y la "retención en plasma (sangre) superior", respectivamente, y se trata de sinónimos.

En la presente documentación, la reducción de la actividad de unión al antígeno a pH ácido, en comparación con la actividad a pH neutro, hace referencia a la reducción de la capacidad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a un pH de entre 4,0 y 6,5, en comparación con la actividad a un pH de entre 6,7 y 10,0, preferiblemente la reducción de la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a un pH de entre 5,5 y 6,5, en comparación con la actividad a un pH de entre 7,0 y 8,0, y más preferiblemente, la reducción de la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a un pH de 5,8, en comparación con la actividad a un pH de 7,4. Por consiguiente, en la presente invención, el pH ácido típicamente es un pH de entre 4,0 y 6,5, preferiblemente es un pH de entre 5,5 y 6,5, y más preferiblemente,

es un pH de 5,8. Como alternativa, en la presente invención, el pH neutro típicamente es un pH de entre 6,7 y 10,0, preferiblemente un pH de entre 7,0 y 8,0, y más preferiblemente, es un pH de 7,4.

En la presente documentación, la frase “reducir la capacidad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a pH ácido, en comparación con la actividad a pH neutro” puede usarse indistintamente con la frase “incrementar la capacidad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a pH neutro, en comparación con la actividad a pH ácido”. En otras palabras, la diferencia en la capacidad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno debería aumentar entre pH ácido y pH neutro. Por ejemplo, el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ debería aumentar, como se describirá más adelante. La diferencia en la capacidad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno entre pH ácido y pH neutro puede aumentar, por ejemplo, mediante la reducción de la capacidad de unión al antígeno a pH ácido y/o el incremento de la capacidad de unión al antígeno a pH neutro.

Las condiciones distintas del pH para determinar la actividad de unión al antígeno pueden ser seleccionadas apropiadamente por aquellos entrenados en la técnica, y las condiciones no se hallan particularmente limitadas. La actividad de unión al antígeno puede determinarse, por ejemplo, bajo condiciones que comprenden amortiguador MES y 37°C, como se describe en los ejemplos en la presente documentación. Además, la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno puede determinarse con métodos conocidos por aquellos entrenados en la técnica, por ejemplo, usando Biacore (GE Healthcare), o semejantes, como se describe en los ejemplos en la presente documentación. Cuando el antígeno es un antígeno soluble, la actividad de unión al antígeno soluble puede evaluarse inyectando el antígeno como analito en un chip donde se halla inmovilizada la molécula de unión al antígeno. Como alternativa, cuando el antígeno es un antígeno de membrana, la actividad de unión al antígeno de membrana puede evaluarse inyectando la molécula de unión al antígeno como analito en un chip con antígenos inmovilizados.

En la presente invención, la diferencia en la actividad de unión al antígeno entre pH ácido y pH neutro no se halla particularmente limitada, siempre y cuando la actividad de unión al antígeno a pH ácido sea menor que la actividad a pH neutro. Sin embargo, el

valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$, que es una relación entre la constante de disociación (KD) contra un antígeno a pH 5,8 y a pH 7,4, preferiblemente es de 2 o más, más preferiblemente 10 o más, y aún más preferiblemente 40 o más. El límite superior del valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ no se halla particularmente limitado, y puede tratarse de cualquier valor, por ejemplo, 400, 1000 ó 10000, siempre que la molécula pueda ser producida con tecnologías conocidas por aquellos entrenados en la técnica. Cuando el antígeno es un antígeno soluble, la actividad de unión al antígeno puede presentarse en términos de la constante de disociación (KD). Como alternativa, cuando el antígeno es un antígeno de membrana, la actividad de unión al antígeno puede presentarse en términos de la constante de disociación aparente. La constante de disociación (KD) y la constante de disociación aparente (KD aparente) pueden determinarse con métodos conocidos por aquellos entrenados en la técnica, por ejemplo, usando Biacore (GE healthcare), Scatchard plot o FACS.

Como alternativa, es posible usar, por ejemplo, k_d , la constante de la velocidad de disociación, como indicador de la diferencia en la actividad de unión al antígeno entre pH ácido y pH neutro. Cuando la constante de la velocidad de disociación (k_d) se usa como indicador de la diferencia en la actividad de unión en lugar de la constante de disociación (KD), el valor de $k_d(pH\ 5,8)/k_d(pH\ 7,4)$, que es una relación entre la constante de la velocidad de disociación (k_d) contra un antígeno a pH 5,8 y a pH 7,4, preferiblemente es de 2 o más, más preferiblemente 5 o más, aún más preferiblemente 10 o más, y aún más preferiblemente 30 o más. El límite superior del valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ no se halla particularmente limitado, y puede tratarse de cualquier valor, por ejemplo, 50, 100 ó 200, siempre que sea posible producir la molécula con tecnologías conocidas por aquellos entrenados en la técnica.

Cuando el antígeno es un antígeno soluble, la actividad de unión al antígeno puede presentarse en términos de la constante de la velocidad de disociación (k_d). Como alternativa, cuando el antígeno es un antígeno de membrana, la actividad de unión al antígeno puede presentarse en términos de la constante de la velocidad de disociación aparente. La constante de la velocidad de disociación (k_d) y la constante de la velocidad de disociación aparente (k_d aparente) pueden determinarse con métodos conocidos por

aquellos entrenados en la técnica, por ejemplo, usando Biacore (GE healthcare) o FACS.

En la presente invención, cuando la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno se determina a distintos pH, es preferible que, salvo por el pH, las condiciones de medición sean constante.

Los métodos para reducir la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a pH 5,8, en comparación con la actividad a pH 7,4 (métodos para conferir una capacidad de unión dependiente del pH) no se hallan particularmente limitados, y pueden ser cualquier método. Estos métodos pueden incluir, por ejemplo, métodos para reducir la actividad de unión al antígeno a pH 5,8, en comparación con la actividad a pH 7,4, que comprenden sustituir aminoácidos por histidina en la molécula de unión al antígeno o insertar histidina en la molécula de unión al antígeno. Se sabe que a un anticuerpo puede conferírsele una actividad de unión al antígeno dependiente del pH sustituyendo aminoácidos por histidina en el anticuerpo (FEBS Letter, 309(1), 8588 (1992)). Los sitios para realizar esta mutación por histidina (sustitución) o esta inserción de histidina no se hallan particularmente limitados, y cualquier sitio será aceptable, siempre y cuando la actividad de unión al antígeno a pH 5,8 sea menor que a pH 7,4 (el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ aumenta), en comparación con la situación previa a la mutación o la inserción. Cuando la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo, estos sitios incluyen, por ejemplo, sitios dentro de la región variable del anticuerpo. La cantidad apropiada de sitios para realizar la mutación por histidina o la inserción de histidina podrá ser determinada apropiadamente por aquellos entrenados en la técnica. La mutación por histidina o la inserción de histidina pueden realizarse en un solo sitio, o en dos o más sitios. También es posible introducir mutaciones por aminoácidos distintos de histidina (sustituciones por aminoácidos distintos de histidina) de manera simultánea. Además, la mutación por histidina puede introducirse de manera simultánea con la inserción de histidina. Es posible realizar la sustitución por histidina o la inserción de histidina al azar, usando un método tal como la búsqueda de histidina, donde, en un análisis de alanina conocido por aquellos entrenados en la técnica, se usa histidina en lugar de alanina. Como alternativa, las moléculas de unión al antígeno cuyo valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ es mayor, en comparación con la situación previa a la mutación,

pueden seleccionarse entre una biblioteca de moléculas de unión al antígeno con mutaciones por histidina o inserciones de histidina al azar.

Cuando se sustituyen aminoácidos por histidina en una molécula de unión al antígeno, o cuando se inserta histidina entre los aminoácidos de la molécula, es preferible, pero no necesario, que la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 7,4 después de la sustitución por histidina o la inserción de histidina sea comparable a la actividad a pH 7,4 previa a la sustitución por histidina o la inserción de histidina. La "actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 7,4 después de la sustitución por histidina o la inserción de histidina es comparable a la actividad a pH 7,4 antes de la sustitución por histidina o la inserción de histidina" denota que, aún después de la sustitución por histidina o la inserción de histidina, la molécula de unión al antígeno retiene 10% o más, preferiblemente 50% o más, más preferiblemente 80% o más, y aún más preferiblemente 90% o más de la actividad de unión al antígeno que presentaba antes de la sustitución por histidina o la inserción de histidina. Cuando la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno ha sido reducida debido a la sustitución por histidina o la inserción de histidina, la actividad de unión al antígeno puede ajustarse introduciendo sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones de uno o más aminoácidos en la molécula de unión al antígeno, de modo que la actividad de unión al antígeno se comparable a la actividad previa a la sustitución por histidina o la inserción de histidina. En la presente invención también se incluyen moléculas de unión al antígeno que tienen una actividad de unión comparable como resultado de la sustitución, la supresión, la adición y/o la inserción de uno o más aminoácidos, después de la sustitución por histidina o la inserción de histidina.

Otros métodos para reducir la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a pH 5,8, en comparación con la actividad a pH 7,4, incluyen métodos para sustituir aminoácidos por aminoácidos no naturales en una molécula de unión al antígeno, o para insertar aminoácidos no naturales entre los aminoácidos de una molécula de unión al antígeno. Se sabe que el pKa puede ser controlado de manera artificial usando aminoácidos no naturales (Angew. Chem. Int. Ed. 2005, 44, 34; Chem Soc Rev. 10 de Septiembre de 2004;33(7):422-30; Amino Acids. 1999;16(3-4):345-79).

Por ende, en la presente invención, es posible usar aminoácidos no naturales en lugar de la histidina descrita con anterioridad. La sustitución por aminoácidos no naturales y/o la inserción de aminoácidos no naturales pueden realizarse de manera simultánea con la sustitución por histidina y/o la inserción de histidina descritas con anterioridad. En la presente invención puede usarse cualquier aminoácido no natural. Es posible usar aminoácidos no naturales conocidos por aquellos entrenados en la técnica.

Además, cuando la molécula de unión al antígeno es una sustancia que tiene una región constante de anticuerpo, los métodos alternativos para reducir la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 5,8, en comparación con la actividad a pH 7,4, incluyen métodos para modificar la región constante de anticuerpo contenida en la molécula de unión al antígeno. Estos métodos para modificar la región constante de anticuerpo incluyen, por ejemplo, métodos de sustitución por una región constante como la que se describe en los ejemplos en la presente documentación.

Otros métodos para modificar la región constante de anticuerpo incluyen, por ejemplo, métodos para evaluar los isotipos de diversas regiones constantes (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) y seleccionar un isotipo que reduzca la actividad de unión al antígeno a pH 5,8 (que incremente la velocidad de disociación a pH 5,8). Como alternativa, los métodos incluyen métodos para reducir la actividad de unión al antígeno a pH 5,8 (incrementar la velocidad de disociación a pH 5,8) que comprenden sustituir aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un isotipo tipo salvaje (la secuencia de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 tipo salvaje). La secuencia de la región bisagra de una región constante de anticuerpo es considerablemente diferente entre los isotipos (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), y la diferencia en la secuencia de aminoácidos de la región bisagra tiene un gran impacto sobre la actividad de unión al antígeno. Por lo tanto, es posible seleccionar un isotipo apropiado para reducir la actividad de unión al antígeno a pH 5,8 (incrementar la velocidad de disociación a pH 5,8) teniendo en cuenta el tipo de antígeno o epítopo. Además, como la diferencia en la secuencia de aminoácidos de la región bisagra tiene una influencia significativa sobre la actividad de unión al antígeno, se asume que los sitios preferidos para realizar las sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un isotipo tipo salvaje se hallarán en la región bisagra.

Cuando la actividad de unión al antígeno de la sustancia de unión al antígeno a pH 5,8 se halla debilitada en comparación con la actividad a pH 7,4 (cuando aumenta el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$), debido a la aplicación de los métodos descriptos con anterioridad y métodos semejantes, generalmente es preferible que el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ sea el doble o más, más preferiblemente el quíntuple o más, y aún más preferiblemente diez veces o más el valor del anticuerpo original, aunque la invención no se halla particularmente limitada en este aspecto.

En la presente documentación, la "mejora de la farmacocinética" hace referencia a la prolongación del período requerido para eliminar la molécula de unión al antígeno del plasma (por ejemplo, un estado donde la molécula de unión al antígeno no puede regresar al plasma debido a que ha sido degradada en las células, u otras razones) después de su administración en un animal, tal como un ser humano, un ratón, una rata, un mono, un conejo o un perro, y también hace referencia a la prolongación del período de retención en plasma de la molécula de unión al antígeno en una forma capaz de unirse a los antígenos (por ejemplo, una forma libre de antígenos), durante el período previo a su eliminación del plasma, después de la administración. Aún si una molécula de unión al antígeno circule en plasma, no podrá unirse a un antígeno cuando ya esté unida a otro antígeno. Por consiguiente, el período en el que la molécula de unión al antígeno puede unirse nuevamente a otro antígeno se prolonga (se incrementa la probabilidad de que se una a otro antígeno) prolongando el período en el que la molécula de unión al antígeno se halla en una forma libre de antígenos. Esto permite acortar el período en el que el antígeno está libre de moléculas de unión al antígeno *in vivo* (en otras palabras, permite prolongar el período en el que el antígeno está unido a una molécula de unión al antígeno). Por ejemplo, la relación entre los antígenos unidos a las moléculas de unión al antígeno y los antígenos en el plasma corporal (total de moléculas de antígeno unidas y libres de las moléculas de unión al antígeno) generalmente se reduce en un período de tiempo determinado, después de la administración de las moléculas de unión al antígeno. Sin embargo, esta disminución puede suprimirse (por ejemplo, puede reducirse el grado de disminución) prolongando el período de retención de las moléculas de unión al antígeno, en una forma capaz de unirse a los antígenos. Esto resulta en un incremento en la relación entre los antígenos

unidos a las moléculas de unión al antígeno y los antígenos en el cuerpo, en un período de tiempo determinado, después de la administración del anticuerpo.

Específicamente, en la presente invención, la “mejora de la farmacocinética” no hace referencia necesariamente a la prolongación (extensión) del período requerido para la eliminación de la molécula de unión al antígeno después de la administración. Aún si el período requerido para la eliminación de la molécula de unión al antígeno después de la administración permanece inalterado, en la presente invención puede decirse que la farmacocinética ha sido “mejorada” si (1) se prolonga el período de retención en plasma de la molécula de unión al antígeno, en una forma capaz de unirse a un antígeno (por ejemplo, la molécula de unión al antígeno en una forma libre de antígenos); (2) se acorta el período en el que el antígeno está libre de una molécula de unión al antígeno en el cuerpo (en otras palabras, se prolonga el período en el que la molécula de unión al antígeno está unida al antígeno); y (3) se incrementa la relación entre los antígenos unidos a las moléculas de unión al antígeno y los antígenos en el cuerpo. Por consiguiente, en la presente invención, la “mejora de la farmacocinética” abarca al menos

- (1) la prolongación del período requerido para la eliminación de la molécula de unión al antígeno del plasma, después de la administración de la molécula de unión al antígeno;
- (2) la prolongación del período de retención en plasma de la molécula de unión al antígeno, en una forma capaz de unirse a un antígeno, después de la administración de la molécula de unión al antígeno;
- (3) el acortamiento del período en el que el antígeno está libre de una molécula de unión al antígeno en el cuerpo, después de la administración de la molécula de unión al antígeno (prolongación del período en el que la molécula de unión al antígeno está unida a un antígeno en el cuerpo); y
- (4) el incremento de la relación entre los antígenos unidos a las moléculas de unión al antígeno y el antígeno en el cuerpo.

Cuando el antígeno es un antígeno soluble presente en el plasma, aún si la farmacocinética de la molécula de unión al antígeno (velocidad de eliminación del plasma) es equivalente, hay casos donde se acelera la eliminación del antígeno unido a la molécula de unión al antígeno. La reducción de la farmacocinética del antígeno

(aceleración de la eliminación del plasma) resulta en una mejora relativa de la farmacocinética de la molécula de unión al antígeno, lo que resulta en la prolongación del período de tiempo en el que la molécula de unión al antígeno está presente en el plasma, en una forma capaz de unirse a los antígenos. Por lo tanto, en una realización, la "mejora de la farmacocinética" de las moléculas de unión al antígeno de la presente invención incluye el incremento de la velocidad de eliminación de los antígenos solubles del plasma, después de la administración de las moléculas de unión al antígeno (capacidad de la molécula de unión al antígeno de eliminar los antígenos del plasma).

En la presente invención, cuando el antígeno es un antígeno de membrana, es posible determinar si una sola molécula de unión al antígeno se une a múltiples antígenos evaluando si mejora la farmacocinética de la molécula de unión al antígeno. La determinación de la "mejora de la farmacocinética" puede realizarse con el siguiente método. Por ejemplo, puede evaluarse si se prolonga el período requerido para la eliminación de una molécula de unión al antígeno después de la administración determinando cualquiera de los parámetros relacionados con la molécula de unión al antígeno, tales como la vida media en plasma, el período promedio de retención en plasma y la eliminación del plasma ("Pharmacokinetics: Enshunioru Rikai (Understanding through practice)" Nanzando). Por ejemplo, cuando se prolonga la vida media en plasma o el período promedio de retención en plasma de una molécula de unión al antígeno administrada a ratones, ratas, monos, conejos, perros, seres humanos u otros animales, se establece que la farmacocinética de la molécula de unión al antígeno ha mejorado. Estos parámetros pueden determinarse con métodos conocidos por aquellos entrenados en la técnica. Por ejemplo, los parámetros pueden ser evaluados apropiadamente con un análisis no compartimentalizado, usando el software de análisis farmacocinético WinNonlin (pH arsiteht), de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto.

Como alternativa, puede evaluarse si se ha prolongado el período de retención en plasma de una molécula de unión al antígeno, en una forma capaz de unirse a los antígenos, después de la administración de la molécula de unión al antígeno, midiendo la concentración en plasma de la molécula de unión al antígeno libre de antígenos, y determinando cualquiera de los parámetros propios de la molécula de unión al antígeno

libre de antígenos, tales como la vida media en plasma, el período promedio de retención en plasma y la eliminación del plasma. La concentración de la molécula de unión al antígeno libre de antígenos en plasma puede medirse con métodos conocidos por aquellos entrenados en la técnica. Por ejemplo, estas mediciones se describen en Clin Farmacol. Abril de 2008;48(4):406-17.

Además, es posible determinar si se ha acortado el período en el que un antígeno está libre de las moléculas de unión al antígeno en el cuerpo (si se ha prolongado el período en el que la molécula de unión al antígeno está unida a un antígeno en el cuerpo), después de la administración de las moléculas de unión al antígeno, determinando la concentración en plasma del antígeno no unido que está libre de moléculas de unión al antígeno, y considerando el período en el que la concentración de antígeno libre en plasma o la relación entre las cantidades de antígeno libre y antígeno total permanecen bajas. La concentración en plasma del antígeno libre o la relación entre las cantidades de antígeno libre y antígeno total pueden determinarse con métodos conocidos por aquellos entrenados en la técnica. Por ejemplo, estas mediciones se describen en Pharm Res. Enero de 2006;23(1):95-103. Como alternativa, cuando el antígeno ejerce una cierta función *in vivo*, puede determinarse si el antígeno está unido con una molécula de unión al antígeno que neutraliza la función del antígeno (molécula antagónica) evaluando si se neutraliza la función del antígeno. Es posible evaluar si se neutraliza la función del antígeno analizando un marcador *in vivo* que refleje la función del antígeno. Puede determinarse si el antígeno se ha unido a una molécula de unión al antígeno que activa la función del antígeno (molécula agónica) analizando un marcador *in vivo* que refleje la función del antígeno.

No hay limitaciones particulares para la determinación de la concentración en plasma del antígeno libre y la relación entre las cantidades de antígeno libre y antígeno total, o para el análisis con marcadores *in vivo*, pero la determinación preferiblemente se efectúa después de un período determinado, después de la administración de una sustancia de unión al antígeno. En la presente invención, este período después de la administración de una sustancia de unión al antígeno no se halla particularmente limitado, y el período apropiado puede ser determinado por aquellos entrenados en la técnica, dependiendo de las propiedades de la sustancia de unión al antígeno

administrada, y factores semejantes. Los ejemplos de este período incluyen un día después de la administración de una sustancia de unión al antígeno; tres días después de la administración de una sustancia de unión al antígeno, siete días después de la administración de una sustancia de unión al antígeno, 14 días después de la administración de una sustancia de unión al antígeno y 28 días después de la administración de una sustancia de unión al antígeno.

En la presente invención, es preferible mejorar la farmacocinética en el ser humano. Aún cuando la retención en plasma en el ser humano sea difícil de determinar, es posible predecirla sobre la base de la retención en plasma en ratones (por ejemplo, ratones normales, ratones transgénicos donde se expresan antígenos humanos, y ratones transgénicos donde se expresan FcRn humanos) o monos (por ejemplo, monos macacos).

Los métodos para determinar la retención en plasma no se hallan particularmente limitados. La determinación puede realizarse, por ejemplo, de acuerdo con los métodos que se describen en los ejemplos en la presente documentación.

Es posible determinar si una molécula de unión al antígeno es capaz de unirse varias veces a los antígenos evaluando si el antígeno unido a una molécula de unión al antígeno, bajo una condición neutra propia del plasma, se disocia del mismo modo que bajo una condición ácida propia de los endosomas, y analizando cuántos antígenos pueden unirse con la molécula de unión al antígeno bajo la condición neutra. Específicamente, la evaluación puede realizarse permitiendo que la molécula de unión al antígeno y el antígeno formen un complejo bajo una condición neutra, exponiendo el complejo a una condición ácida por un período predeterminado, y luego determinando si la molécula de unión al antígeno puede unirse nuevamente a un antígeno bajo la condición neutra, usando un dispositivo para evaluar las reacciones de las moléculas de unión al antígeno y los antígenos, tal como Biacore. Cuando la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno que presenta una dependencia del pH ha sido mejorada hasta alcanzar el doble de la capacidad que presentaba la molécula de unión al antígeno antes de la modificación, es posible establecer que la cantidad de veces que se une la molécula de unión al antígeno que presenta la capacidad de unión dependiente del pH es el doble de la cantidad correspondiente a la molécula de unión al

antígeno antes de la modificación. Como alternativa, cuando el antígeno es un antígeno de membrana, y por lo tanto, la molécula de unión al antígeno es eliminada del plasma por medio de la captación mediada por el antígeno y la degradación en un lisosoma, puede determinarse si aumenta la cantidad de veces que se une la molécula de unión al antígeno que presenta una capacidad de unión dependiente del pH, en comparación con la cantidad previa a la modificación, comparando la farmacocinética o la duración de la unión al antígeno entre la molécula de unión al antígeno que presenta una capacidad de unión dependiente del pH y la molécula de unión al antígeno antes de la modificación. Por ejemplo, cuando la duración de la unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno que presenta una capacidad de unión dependiente del pH se prolonga hasta el doble de la duración correspondiente a la molécula de unión al antígeno antes de la modificación, puede establecerse que la cantidad de veces que se une la molécula de unión al antígeno que presenta una capacidad de unión dependiente del pH ha aumentado hasta el doble, en comparación con la molécula de unión al antígeno antes de la modificación. Como alternativa, cuando se determina la concentración en plasma de un antígeno no unido, que está libre de la molécula de unión al antígeno, y cuando el período en el que la concentración en plasma del antígeno libre o la relación entre las cantidades de antígeno libre y el antígeno total permanecen bajas se prolonga hasta el doble, puede establecerse que la cantidad de veces que se une la molécula de unión al antígeno que presenta una capacidad de unión dependiente del pH ha aumentado hasta el doble, en comparación con la molécula de unión al antígeno antes de la modificación.

Cuando el antígeno es un antígeno soluble, si el antígeno unido a una molécula de unión al antígeno bajo la condición neutra en plasma se disocia en un endosoma, y si la molécula de unión al antígeno regresa al plasma, la molécula de unión al antígeno puede unirse nuevamente a un antígeno bajo la condición neutra en plasma. Por ende, una molécula de unión al antígeno que puede disociarse de un antígeno bajo la condición ácida propia de un endosoma es capaz de unirse a varias veces a los antígenos. En comparación con la situación en la que el antígeno unido a una molécula de unión al antígeno no se disocia en un endosoma (el antígeno permanece unido a la molécula de unión al antígeno cuando regresa al plasma), cuando el antígeno unido a una molécula de unión al antígeno se disocia en endosomas, el antígeno es

transportado a un lisosoma y luego degradado, por lo que aumenta la velocidad de eliminación del antígeno del plasma. Vale decir, también es posible determinar si la molécula de unión al antígeno es capaz de unirse varias veces a los antígenos usando la velocidad de eliminación del antígeno del plasma como indicador. La velocidad de eliminación del antígeno del plasma puede determinarse, por ejemplo, administrando los antígenos y las moléculas de unión al antígeno *in vivo*, y luego midiendo la concentración de antígenos en plasma. Cuando el antígeno se produce o se secreta *in vivo*, la concentración en plasma del antígeno se reduce si aumenta la velocidad de eliminación del antígeno del plasma. Por lo tanto, también es posible determinar si la molécula de unión al antígeno es capaz de unirse varias veces a los antígenos usando la concentración en plasma del antígeno como indicador.

En la presente documentación, el “incremento de la cantidad de veces que se une a los antígenos la molécula de unión al antígeno” hace referencia al incremento de la cantidad de ciclos, cuando se toma un ciclo como el proceso en el que una molécula de unión al antígeno administrada a un ser humano, un ratón, un mono, o un animal similar, se une a un antígeno y es internalizada en una célula. Específicamente, en la presente documentación, “la molécula de unión al antígeno se une dos veces a un antígeno” denota que la molécula de unión al antígeno unida a un antígeno ha sido internalizada en una célula y liberada en una forma libre de antígeno, y que luego, la molécula de unión al antígeno liberada se ha unido nuevamente con otro antígeno y ha sido internalizada en una célula nuevamente.

Cuando la molécula de unión al antígeno ha sido internalizada en una célula, puede hallarse en una forma unida a un solo antígeno, o dos o más antígenos.

En la presente documentación, “el incremento de la cantidad de veces que se une a los antígenos una molécula de unión al antígeno” no denota necesariamente que la cantidad de veces que tiene lugar la unión con antígeno aumente en todas las moléculas de unión al antígeno. Por ejemplo, entre las moléculas de unión al antígeno en una composición de moléculas de unión al antígeno, puede aumentar la relación entre las moléculas de unión al antígeno unidas a los antígenos dos o más veces, o puede aumentar la cantidad promedio de acontecimientos de unión de las moléculas de unión al antígeno en una composición de moléculas de unión al antígeno.

En la presente invención, es preferible que la cantidad de veces que se une a los antígenos una molécula de unión al antígeno aumente cuando la molécula le sea administrada a un ser humano. Sin embargo, cuando es difícil determinar la cantidad de veces que tiene lugar la unión al antígeno en un ser humano, es posible predecir esta cantidad en un ser humano sobre la base de los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* o mediciones usando ratones (por ejemplo, ratones transgénicos donde se expresan antígenos humanos y ratones transgénicos donde se expresan FcRn humanos) o monos (por ejemplo, monos macacos).

En la presente invención, es preferible que una molécula de unión al antígeno se una a los antígenos dos o más veces. Por ejemplo, es preferible que, de las moléculas de unión al antígeno en una composición de moléculas de unión al antígeno, al menos 10% o más, preferiblemente 30% o más, más preferiblemente 50% o más, y aún más preferiblemente 80% o más (por ejemplo, 90% o más, 95% o más, y así sucesivamente) se unan a los antígenos dos o más veces.

En la presente documentación, el “incremento de la cantidad de antígenos a los que puede unirse una molécula de unión al antígeno” hace referencia al incremento de la cantidad de antígenos a los que puede unirse una molécula de unión al antígeno durante el período que transcurre hasta que la molécula de unión al antígeno se degrada en un lisosoma de la célula, después de la administración de la molécula de unión al antígeno a un animal, tal como un ser humano, un ratón o un mono.

En general, los anticuerpos, tales como la IgG, tienen dos dominios de unión, por lo que un solo anticuerpo se une a un máximo de dos antígenos. Un anticuerpo unido a uno o más antígenos es internalizado en una célula, y el anticuerpo y el o los antígenos son degradados en un lisosoma. En general, los anticuerpos, tales como las IgG, pueden unirse a un máximo de dos antígenos. Cuando se reduce la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno, tal como un anticuerpo, al pH endosómico, en comparación con la actividad al pH del plasma, de acuerdo con los métodos de la presente invención, la molécula de unión al antígeno, tal como un anticuerpo que ha sido internalizado en una célula, se disocia del antígeno y es liberada de la célula, por lo que puede unirse una vez más a otro antígeno. En otras palabras, los métodos de la presente invención permiten que una molécula de unión al antígeno se

una a más antígenos que la cantidad de sitios de unión al antígeno que posee. Específicamente, al usar los métodos de la presente invención, por ejemplo, una IgG con dos sitios de unión al antígeno puede unirse a tres o más antígenos, preferiblemente cuatro o más antígenos, durante el período que transcurre hasta que se degrada el anticuerpo, después de la administración. Por ejemplo, cuando el anticuerpo es un anticuerpo neutralizador, el “incremento de la cantidad de antígenos a los que puede unirse una molécula de unión al antígeno” es un término que puede usarse indistintamente con el “incremento de la cantidad de antígenos que puede neutralizar la molécula de unión al antígeno”. Por ende, la “unión” puede reemplazarse por la “neutralización” cuando el anticuerpo es un anticuerpo neutralizador.

En la presente invención, el “incremento de la cantidad de antígenos a los que puede unirse una molécula de unión al antígeno” no denota necesariamente el incremento de la cantidad de antígenos a los que puede unirse cada molécula de unión al antígeno. Por ejemplo, puede aumentar la cantidad promedio de antígenos a los que puede unirse una molécula de unión al antígeno en una composición de moléculas de unión al antígeno, o puede aumentar la proporción de moléculas de unión al antígeno que pueden unirse a más antígenos en lugar de la cantidad de sitios de unión al antígeno que poseen.

En la presente invención, es preferible que la cantidad de antígenos a los que puede unirse una molécula de unión al antígeno aumente cuando se le administre la molécula a un ser humano. Sin embargo, cuando resulte difícil determinar la cantidad en el ser humano, será posible predecirla sobre la base de los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* o mediciones usando ratones (por ejemplo, ratones transgénicos donde se expresan antígenos humanos y ratones transgénicos donde se expresan FcRn humanos) o monos (por ejemplo, monos macacos). Cuando el anticuerpo es un anticuerpo neutralizador, generalmente se asume que la cantidad de veces que se une a los antígenos la molécula de unión al antígeno está correlacionada con la cantidad de antígenos que pueden ser neutralizados por una molécula de unión al antígeno. Por ende, la cantidad de antígenos que pueden ser neutralizados por una molécula de unión al antígeno puede determinarse con los mismos métodos descriptos con anterioridad para determinar la cantidad de veces que se une una molécula de unión al antígeno.

Además, en la presente invención se proveen métodos para unir una molécula de unión al antígeno dos o más veces al antígeno en el cuerpo, que comprenden administrar una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH ácido es menor que a pH neutro.

La presente invención también se relaciona con métodos para neutralizar antígenos que se hayan en mayor cantidad que la cantidad de sitios de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno que presenta la actividad de neutralización, que comprenden administrar la molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH ácido es menor que a pH neutro. Preferiblemente, la presente invención se relaciona con métodos para neutralizar tres o más antígenos, preferiblemente cuatro o más antígenos, que comprenden administrar una IgG cuya actividad de unión al antígeno a pH ácido es menor que a pH neutro.

La presente invención también se relaciona con métodos para disociar, dentro de una célula, un antígeno de una molécula de unión al antígeno que se unió desde el exterior de la célula, que comprenden reducir la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH ácido, en comparación con la actividad a pH neutro. En la presente invención, el antígeno puede disociarse de la molécula de unión al antígeno en cualquier sitio dentro de una célula. Sin embargo, es preferible que el antígeno se disocie dentro de un endosoma temprano. En la presente invención, "un antígeno dentro de una célula se disocia de una molécula de unión al antígeno que se unió desde el exterior de la célula" no denota necesariamente que cada antígeno que haya sido internalizado en la célula al unirse a la molécula de unión al antígeno se disocie de la molécula de unión al antígeno dentro de la célula. Es aceptable que la proporción de antígenos que se disocian de la molécula de unión al antígeno en una célula aumente en comparación con la situación previa a la reducción de la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH ácido, en comparación con la actividad a pH neutro.

Además, la presente invención se relaciona con métodos para mejorar la unión intracelular de una molécula de unión al antígeno libre de un antígeno de FcRn, que comprenden reducir la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH ácido, en comparación con la actividad a pH neutro. En general, FcRn se

une a una molécula de unión al antígeno en un endosoma. Sin embargo, se asume que una molécula de unión al antígeno unida a un antígeno de membrana no se unirá a FcRn. Por lo tanto, en una realización preferida, cuando el antígeno es un antígeno unido a membrana, en la presente invención se incluyen métodos para mejorar la disociación endosómica de antígenos de moléculas de unión al antígeno, lo que permite mejorar la unión entre FcRn y las moléculas de unión al antígeno, que comprenden reducir la capacidad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno al pH endosómico (pH ácido), en comparación con la actividad al pH del plasma (pH neutro). Cuando el antígeno es un antígeno soluble, la molécula de unión al antígeno puede unirse a FcRn en presencia o ausencia del antígeno. Si es posible promover la disociación del antígeno de la molécula de unión al antígeno en los endosomas mediante la reducción de la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno al pH intraendosómico (ácido), en comparación con la actividad al pH del plasma (neutro), es posible mejorar la unión a FcRn de la molécula de unión al antígeno que está “libre de antígenos” con los métodos de la presente invención.

Independientemente de que el antígeno esté unido a membrana o sea soluble, si una molécula de unión al antígeno libre de antígenos puede regresar al plasma con FcRn, la molécula de unión al antígeno podrá unirse nuevamente a un antígeno. Al repetirse este proceso, la molécula de unión al antígeno puede unirse a los antígenos varias veces. En la presente invención, la “mejora de la unión a FcRn de una molécula de unión al antígeno en una célula” no denota necesariamente que cada molécula de unión al antígeno se una a FcRn. Es aceptable que la proporción de moléculas de unión al antígeno libres de antígenos que se unen a FcRn en una célula aumente en comparación con la situación previa a la reducción de la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno al pH endosómico, en comparación con la actividad al pH del plasma. Las moléculas de unión al antígeno preferidas en los métodos de la presente invención para mejorar la unión intracelular entre la molécula de unión al antígeno y FcRn incluyen, por ejemplo, moléculas de unión al antígeno que se unen a antígenos unidos a membrana (antígenos de membrana), tales como proteínas de membrana. Otras moléculas de unión al antígeno preferidas incluyen moléculas de unión al antígeno que se unen a antígenos solubles, tales como proteínas solubles.

Como alternativa, los métodos para mejorar la unión entre una molécula de unión al antígeno y FcRn en una célula se describen como métodos para promover la unión a FcRn de una molécula de unión al antígeno en una célula, por ejemplo, en endosomas.

Además, la presente invención se relaciona con métodos para liberar de la célula una molécula de unión al antígeno que ha estado unida a un antígeno y ha sido internalizada en una célula, en una forma libre de antígeno, que comprenden reducir la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH ácido, en comparación con su capacidad a pH neutro. En la presente invención, la "liberación de la célula de una molécula de unión al antígeno que ha estado unida a un antígeno y ha sido internalizada en una célula, en una forma libre de antígeno" no denota necesariamente que cada molécula de unión al antígeno que haya estado unida a un antígeno y haya sido internalizada en una célula sea liberada de la célula en una forma libre de antígeno. Es aceptable que la proporción de moléculas de unión al antígeno que son liberadas de la célula aumente en comparación con la situación previa a la reducción de la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH ácido, en comparación con la actividad a pH neutro. Es preferible que la molécula de unión al antígeno liberada de la célula retenga su capacidad de unión al antígeno. Además, el método para liberar de la célula una molécula de unión al antígeno que ha estado unida a un antígeno y ha sido internalizada en una célula, en una forma libre de antígeno, también puede describirse como un método para conferirle a la molécula de unión al antígeno una propiedad que le permita ser liberada más fácilmente de la célula, en una forma libre de antígeno, cuando la molécula de unión al antígeno se haya unido a un antígeno y haya sido internalizada en una célula.

Además, la presente invención se relaciona con métodos para incrementar la capacidad de las moléculas de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma, que comprenden reducir la capacidad de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno a pH ácido, en comparación con la actividad a pH neutro. En la presente invención "la capacidad de eliminar antígenos en plasma" hace referencia a la capacidad de eliminar antígenos que estén presentes en plasma, cuando las moléculas de unión al antígeno se administren *in vivo* o se secreten *in vivo*. Por consiguiente, en la presente

invención, el "incremento la capacidad de la molécula de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma" denota que la velocidad de eliminación de los antígenos del plasma se acelera cuando se administran las moléculas de unión al antígeno *in vivo*, en comparación con la velocidad previa a la reducción de la capacidad de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno a pH ácido, en comparación con la actividad a pH neutro. Es posible determinar si la capacidad de la molécula de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma aumenta, por ejemplo, administrando antígenos solubles y moléculas de unión al antígeno *in vivo*, y luego midiendo la concentración de antígenos solubles en plasma. Cuando la concentración de antígenos solubles en plasma después de la administración de los antígenos solubles y las moléculas de unión al antígeno se reduce, por medio de la reducción de la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH ácido, en comparación con su capacidad a pH neutro, puede establecerse que aumenta la capacidad de la molécula de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma.

La presente invención también se relaciona con métodos para mejorar la farmacocinética de una molécula de unión al antígeno, que comprenden sustituir al menos un aminoácido en la molécula de unión al antígeno por histidina o un aminoácido no natural, o insertar histidina o un aminoácido no natural en la molécula.

Además, en la presente invención se proveen métodos para incrementar la cantidad de veces que se une a los antígenos una molécula de unión al antígeno, que comprenden sustituir al menos un aminoácido en la molécula de unión al antígeno por histidina o un aminoácido no natural, o insertar histidina o un aminoácido no natural en la molécula.

Además, la presente invención se relaciona con métodos para incrementar la cantidad de antígenos a los que puede unirse una molécula de unión al antígeno, que comprenden sustituir al menos un aminoácido en la molécula de unión al antígeno por histidina o un aminoácido no natural, o insertar histidina o un aminoácido no natural en la molécula.

En la presente invención también se proveen métodos para disociar un antígeno en una célula de una molécula de unión al antígeno que se unió desde el exterior de la célula, que comprenden sustituir al menos un aminoácido en la molécula de unión al

antígeno por histidina o un aminoácido no natural, o insertar histidina o aminoácido no natural en la molécula.

En la presente invención también se proveen métodos para liberar de la célula una molécula de unión al antígeno que ha estado unida a un antígeno y ha sido internalizada en una célula, en una forma libre de antígeno, que comprenden sustituir al menos un aminoácido en la molécula de unión al antígeno por histidina o un aminoácido no natural, o insertar histidina o aminoácido no natural en la molécula.

En la presente invención también se proveen métodos para incrementar la capacidad de la molécula de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma, que comprende sustituir al menos un aminoácido en la molécula de unión al antígeno por histidina o un aminoácido no natural, o insertar histidina o aminoácido no natural en la molécula.

El sitio donde tiene lugar la mutación por histidina o un aminoácido no natural (sustitución, inserción, etcétera) no se halla particularmente limitado. Es posible realizar una sustitución o una inserción de histidina o un aminoácido no natural en cualquier sitio. Los sitios preferidos para realizar la sustitución o la inserción de histidina o un aminoácido no natural incluyen, por ejemplo, sitios dentro de una región que afecta la capacidad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno. Por ejemplo, cuando la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo, estos sitios incluyen sitios dentro de la región variable del anticuerpo o la CDR. La cantidad de mutaciones por histidina o aminoácidos no naturales no se halla particularmente limitada. Es posible realizar sustituciones por histidina o aminoácidos no naturales en cualquier sitio individual, o en dos o más sitios. Además, es posible introducir una supresión, la adición, una inserción y/o una sustitución por otros aminoácidos de manera simultánea con la sustitución o inserción de histidina o un aminoácido no natural

En la presente invención, cuando la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo, los sitios posibles para realizar la sustitución por histidina o un aminoácido no natural incluyen, por ejemplo, sitios dentro de la secuencia CDR o la secuencia responsable de la estructura de la CDR de un anticuerpo. Estos sitios incluyen, por ejemplo, los sitios que se detallarán más adelante. Las posiciones de aminoácidos están

numeradas de acuerdo con la numeración de Kabat (Kabat EA *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, NIH).

Cadena pesada: H27, H31, H32, H33, H35, H50, H58, H59, H61, H62, H63, H64, H65, H99, H100b y H102

Cadena liviana: L24, L27, L28, L32, L53, L54, L56, L90, L92 y L94

Entre los sitios anteriores, H32, H61, L53, L90 y L94 podrían ser sitios de modificación universales.

Cuando el antígeno es el receptor de IL-6 (por ejemplo, el receptor de IL-6 humano), los sitios preferibles para la modificación incluyen los que se indicarán más adelante. Sin embargo, los sitios para la modificación no se hallan particularmente limitados a los indicados.

Cadena pesada: H27, H31, H32, H35, H50, H58, H61, H62, H63, H64, H65, H100b y H102

Cadena liviana: L24, L27, L28, L32, L53, L56, L90, L92 y L94

Es posible realizar una sustitución por histidina o un aminoácido no natural en una o más de las posiciones indicadas con anterioridad.

Cuando se realiza una sustitución por histidina o un aminoácido no natural en varios sitios, las combinaciones preferidas de sitios de sustitución incluyen, por ejemplo, la combinación de H27, H31 y H35; la combinación de H27, H31, H32, H35, H58, H62 y H102; la combinación de L32 y L53; y la combinación de L28, L32 y L53. Además, las combinaciones preferidas de sitios de sustitución de las cadenas pesada y liviana incluyen las combinaciones de H27, H31, L32, y L53.

Cuando el antígeno es IL-6 (por ejemplo, IL-6 humana), los sitios preferibles para la modificación incluyen los que se indicarán más adelante. Sin embargo, los sitios para la modificación no se hallan particularmente limitados a los indicados.

Cadena pesada: H32, H59, H61 y H99

Cadena liviana: L53, L54, L90 y L94

Cuando el antígeno es el receptor de IL-31 (por ejemplo, el receptor de IL-31 humano), los sitios preferibles para la modificación incluyen H33. Sin embargo, los sitios para la modificación no se hallan particularmente limitados a los indicados.

Con relación a los sitios anteriores, la sustitución por histidina o un aminoácido no natural solamente puede realizarse en un sitio. Como alternativa, la sustitución por histidina o un aminoácido no natural solamente puede realizarse en varios sitios.

Los métodos de la presente invención pueden aplicarse a cualquier molécula de unión al antígeno, independientemente del tipo de antígeno blanco

Las moléculas de unión al antígeno de la presente invención no se hallan particularmente limitadas, siempre que presenten una actividad de unión específica por el antígeno de interés. Las moléculas de unión al antígeno preferidas de la presente invención incluyen, por ejemplo, sustancias que tienen un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo. El dominio de unión al antígeno de un anticuerpo incluye, por ejemplo, la CDR y la región variable. Cuando el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo es la CDR, la molécula de unión al antígeno puede incluir las seis CDR de un anticuerpo completo, o una o dos o más de ellas. Como alternativa, cuando una molécula de unión al antígeno incluye la CDR como dominio de unión de un anticuerpo, la CDR puede incluir una supresión, una sustitución, una adición y/o una inserción de un aminoácido, o puede ser una CDR parcial.

Además, cuando la molécula de unión al antígeno incluye una región constante de anticuerpo, la presente invención se relaciona con métodos para mejorar la farmacocinética de las moléculas de unión al antígeno mediante la modificación (por ejemplo, la sustitución, la supresión, la adición y/o la inserción de aminoácidos) de la región constante de anticuerpo en la molécula de unión al antígeno.

Además, cuando la molécula de unión al antígeno incluye una región constante de anticuerpo, en la presente invención se proveen métodos para incrementar la cantidad de veces que se une a los antígenos una molécula de unión al antígeno, que comprenden modificar (por ejemplo, mediante la sustitución, la supresión, la adición y/o la inserción de aminoácidos) la región constante de anticuerpo en la molécula de unión al antígeno.

Además, cuando la molécula de unión al antígeno incluye una región constante de anticuerpo, la presente invención se relaciona con métodos para incrementar la cantidad de antígenos a los que puede unirse una molécula de unión al antígeno, que comprenden modificar (por ejemplo, mediante la sustitución, la supresión, la adición y/o

la inserción de aminoácidos) la región constante de anticuerpo en la molécula de unión al antígeno.

Además, cuando la molécula de unión al antígeno incluye una región constante de anticuerpo, la presente invención se relaciona con métodos para disociar, dentro de una célula, un antígeno de una molécula de unión al antígeno que se unió desde el exterior de la célula, que comprenden modificar (por ejemplo, mediante la sustitución, la supresión, la adición y/o la inserción de aminoácidos) la región constante de anticuerpo en la molécula de unión al antígeno.

Además, cuando la molécula de unión al antígeno incluye una región constante de anticuerpo, la presente invención se relaciona con métodos para liberar de la célula una molécula de unión al antígeno que ha estado unida a un antígeno y ha sido internalizada en una célula, en una forma libre de antígeno, que comprenden modificar (por ejemplo, mediante la sustitución, la supresión, la adición y/o la inserción de aminoácidos) la región constante de anticuerpo en la molécula de unión al antígeno.

Además, cuando la molécula de unión al antígeno incluye una región constante de anticuerpo, la presente invención se relaciona con métodos para incrementar la capacidad de una molécula de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma, que comprenden modificar (por ejemplo, mediante la sustitución, la supresión, la adición y/o la inserción de aminoácidos) la región constante de anticuerpo en la molécula de unión al antígeno.

En una realización preferida, la sustancia de unión al antígeno de la presente invención incluye sustancias de unión al antígeno que incluyen una región capaz de unirse a FcRn. Una vez internalizadas en las células, las sustancias de unión al antígeno que incluyen una región capaz de unirse a FcRn pueden regresar al plasma a través de la vía de captura de FcRn. La región capaz de unirse a FcRn preferiblemente es un dominio que se une directamente a FcRn. Las regiones capaces de unirse a FcRn preferidas incluyen, por ejemplo, regiones Fc de anticuerpos. Sin embargo, la región capaz de unirse a FcRn de la presente invención podrá ser una región que sea capaz de unirse a un polipéptido que tenga la capacidad de unirse a FcRn, tal como la albúmina o la IgG, ya que esta región capaz de unirse a un polipéptido que presenta la capacidad de

unirse a FcRn puede unirse indirectamente a FcRn a través de la albúmina, la IgG, etcétera.

Los antígenos reconocidos por las moléculas de unión al antígeno, tales como los anticuerpos de interés en los métodos de la presente invención, no se hallan particularmente limitados. Estos anticuerpos de interés pueden reconocer cualquier antígeno. Los anticuerpos cuya farmacocinética ha de ser mejorada con los métodos de la presente invención incluyen, por ejemplo, anticuerpos que reconocen antígenos de membrana, tales como proteínas receptoras (receptores unidos a membrana y receptores solubles) y marcadores de la superficie celular, y anticuerpos que reconocen antígenos solubles, tales como citoquinas. Los antígenos reconocidos por los anticuerpos cuya farmacocinética ha de ser mejorada con los métodos de la presente invención incluyen, por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-31, IL-23, el receptor de IL-2, el receptor de IL-6, el receptor de OSM, gp130, el receptor de IL-5, CD40, CD4, Fas, la osteopontina, CRTH2, CD26, PDGF-D, CD20, el factor quimiotáctico de los monocitos, CD23, TNF- α , HMGB-1, la integrina α 4, ICAM-1, CCR2, CD11a, CD3, IFN γ , BLyS, HLA-DR, TGF- β y CD52. Los antígenos particularmente preferidos incluyen el receptor de IL-6.

Además, la molécula de unión al antígeno de interés en los métodos de la presente invención incluye moléculas de unión al antígeno que presentan actividad antagónica (moléculas de unión al antígeno antagónicas) y moléculas de unión al antígeno que presentan actividad agónica (moléculas de unión al antígeno agónicas). En una realización preferida, la molécula de unión al antígeno incluye moléculas de unión al antígeno antagónicas, en particular, moléculas de unión al antígeno antagónicas que reconocen antígenos de membrana, tales como receptores, o antígenos solubles, tales como citoquinas. Por ejemplo, una molécula de unión al antígeno antagónica que reconoce un receptor inhibe la unión ligando-receptor al unirse al receptor, por lo que inhibe la señalización mediada por el receptor.

En la presente invención, la molécula de unión al antígeno de interés no se halla particularmente limitada, y puede ser cualquier molécula de unión al antígeno. La molécula de unión al antígeno de la presente invención preferiblemente presenta actividad de unión al antígeno (tiene una región de unión al antígeno) y una región capaz

de unirse a FcRn. En particular, la molécula de unión al antígeno preferida de la presente invención incluye una región que se une a FcRn humano. La molécula de unión al antígeno que presenta actividad de unión al antígeno y una región capaz de unirse a FcRn incluye, por ejemplo, anticuerpos. Los anticuerpos preferidos en el contexto de la presente invención incluyen, por ejemplo, anticuerpos IgG. Cuando el anticuerpo a usar es un anticuerpo IgG, el tipo de IgG no se halla limitado, y puede usarse una IgG que pertenezca a cualquier isotipo (subclase), tal como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Además, pueden introducirse mutaciones de aminoácidos (por ejemplo, M73) en la región constante de cualquier de estos isotipos de IgG. Las mutaciones de aminoácidos que pueden introducirse incluyen, por ejemplo y sin limitaciones, aquellas que potencian o reducen la unión al receptor Fcγ (Proc Natl Acad Sci U S A. 14 de Marzo de 2006;103(11):4005-10), y aquellas que potencian o reducen la unión a FcRn (J Biol Chem. 2 de Marzo de 2001;276(9):6591-604). Como alternativa, también es posible alterar la unión dependiente del pH seleccionando una región constante apropiada, tal como una de la IgG2.

Cuando la molécula de unión al antígeno de interés de la presente invención es un anticuerpo, puede tratarse de un anticuerpo derivado de cualquier animal, tal como un anticuerpo de ratón, un anticuerpo humano, un anticuerpo de rata, un anticuerpo de conejo, un anticuerpo de cabra o un anticuerpo de camello. Además, el anticuerpo puede ser un anticuerpo modificado, por ejemplo, un anticuerpo quimérico, y en particular, un anticuerpo modificado que incluye una sustitución de aminoácidos en la secuencia de un anticuerpo humanizado, etcétera. Los anticuerpos también incluyen anticuerpos biespecíficos, productos de la modificación de anticuerpos unidos a diversas moléculas, y polipéptidos que incluyen fragmentos de anticuerpos.

Los “anticuerpos quiméricos” son anticuerpos que se preparan combinando secuencias derivadas de distintos animales. Específicamente, el anticuerpo quimérico incluye, por ejemplo, anticuerpos que tienen regiones variables (V) de la cadena pesada y la cadena liviana de un anticuerpo de ratón, y regiones constantes (C) de la cadena pesada y la cadena liviana de un anticuerpo humano.

Los “anticuerpos humanizados”, también conocidos como anticuerpos humanos reformados, son anticuerpos donde se han transplantado las regiones de determinación

de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano, por ejemplo, un ratón, dentro de las CDR de un anticuerpo humano. Se conocen métodos para identificar las CDR (Kabat *et al.*, Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chotia *et al.*, Nature (1989) 342:877). También se conocen tecnologías generales de recombinación genética apropiadas para este propósito (véanse la Solicitud de Patente Europea EP 125023 y WO 96/02576).

Un anticuerpo biespecífico hace referencia a un anticuerpo que, en la misma molécula, tiene regiones variables que reconocen distintos epitopes. Un anticuerpo biespecífico puede ser anticuerpo que reconoce dos o más antígenos diferentes, o un anticuerpo que reconoce dos o más epitopes diferentes en un mismo antígeno.

Además, los polipéptidos que incluyen fragmentos de anticuerpos incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, scFv (Nat Biotechnol. Septiembre de 2005;23(9):1126-36), dominios de anticuerpos (dAb) (WO 2004/058821, WO 2003/002609), scFv-Fc (WO 2005/037989), dAb-Fc, y proteínas de fusión con Fc. De éstos, las moléculas que incluyen un dominio Fc son capaces de unirse a FcRn, por lo que son apropiadas para usar en los métodos que se describen en la presente invención.

Además, las moléculas de unión al antígeno que pueden aplicarse a la presente invención pueden ser moléculas similares a anticuerpos. Una molécula similar a un anticuerpo es una molécula que puede presentar funciones de unión a una molécula blanco (Current Opinion in Biotechnology 2006, 17:653-658; Current Opinion in Biotechnology 2007, 18:1-10; Current Opinion in Structural Biology 1997, 7:463-469; Protein Science 2006, 15:14-27), e incluye, por ejemplo, DARPinas (WO 2002/020565), aficuerpos (WO 1995/001937), avímeros (WO 2004/044011; WO 2005/040229) y adnectina (WO 2002/032925). Si estas moléculas similares a anticuerpos pueden unirse a las moléculas blanco de una manera dependiente del pH, es posible que una sola molécula se una a varias moléculas blanco.

Además, la molécula de unión al antígeno puede ser una proteína receptora o una proteína de fusión de un receptor y Fc capaz de unirse a un blanco, incluyendo, por ejemplo, una proteína de fusión TNFR-Fc, una proteína de fusión IL1R-Fc, una proteína

de fusión VEGFR-Fc y una proteína de fusión CTLA4-Fc (Nat Med. Enero de 2003;9(1):47-52; BioDrugs. 2006;20(3):151-60). Si estas proteínas receptoras y estas proteínas de fusión de un receptor y Fc pueden unirse a las moléculas blanco de una manera dependiente del pH, es posible que una única molécula se una a varias moléculas blanco.

Más aún, la molécula de unión al antígeno puede ser una proteína que es un ligando artificial o una proteína de fusión que es un ligando artificial, que se une a un blanco y presenta un efecto neutralizador, incluyendo, por ejemplo, IL-6 mutante (EMBO J. 15 de Diciembre de 1994;13(24):5863-70). Si esta proteína que es un ligando artificial o esta proteína de fusión que es un ligando artificial puede unirse a las moléculas blanco de una manera dependiente del pH, es posible que una única molécula se una a varias moléculas blanco.

Además, los anticuerpos de la presente invención pueden incluir cadenas de azúcares modificadas. Los anticuerpos con cadenas de azúcares modificadas incluyen, por ejemplo, anticuerpos con una glicosilación modificada (WO 99/54342), anticuerpos que son deficientes en fucosa, que se agrega a la cadena de azúcar (WO 00/61739, WO 02/31140, WO 2006/067847, WO2 006/067913), y anticuerpos que tienen cadenas de azúcar con GlcNAc bisectado (WO 02/79255).

Aunque los métodos de la presente invención no se limitan a una teoría específica, la relación entre el debilitamiento de la capacidad de unión al antígeno a pH ácido, en comparación con la actividad a pH neutro, la mejora de la farmacocinética y la unión al antígenos en múltiples ocasiones puede explicarse, por ejemplo, como se detalla a continuación.

Por ejemplo, cuando anticuerpo es un anticuerpo que se une a un antígeno de membrana, el anticuerpo administrado en el cuerpo se une al antígeno, y luego es tomado por internalización en los endosomas en las células, junto con el antígeno, durante lo cual el anticuerpo se mantiene unido al antígeno. Después, el anticuerpo es translocado hasta los lisosomas, durante lo cual el anticuerpo se mantiene unido al antígeno, y el anticuerpo es degradado por lisosoma junto con el antígeno. La eliminación del plasma mediada por internalización se denomina eliminación dependiente del antígeno, y esta eliminación ha sido descripta para numerosas

moléculas de anticuerpos (Drug Discov Today. Enero de 2006;11(1-2):81-8). Cuando una sola molécula de anticuerpo IgG se une a los antígenos de manera divalente, la molécula de anticuerpo individual es internalizada cuando está unida a las dos moléculas de antígeno, y es degradada en el lisosoma. Por consiguiente, en el caso de los anticuerpos típicos, una molécula de anticuerpo IgG no puede unirse a tres o más moléculas de antígeno. Por ejemplo, una sola molécula de anticuerpo IgG con actividad de neutralización no puede neutralizar tres o más moléculas de antígeno.

La retención relativamente prolongada (eliminación lenta) de las moléculas de IgG en el plasma se debe a la función de FcRn, que es conocido como un receptor de captura de moléculas de IgG. Cuando son captadas en endosomas por pinocitosis, las moléculas de IgG se unen a los FcRn expresados en los endosomas, bajo la condición ácida de los endosomas. Mientras que las moléculas de IgG que no se unieron a los FcRn son transferidas a los lisosomas, donde serán degradadas, las moléculas de IgG que se han unido a los FcRn son translocadas a la superficie de la célula, y regresan nuevamente al plasma al disociarse de los FcRn bajo la condición neutra del plasma.

Como alternativa, cuando el antígeno es un antígeno que se une a un antígeno soluble, el anticuerpo administrado en el cuerpo se une al antígeno y es tomado por las células mientras está unido al antígeno. Muchos anticuerpos tomados por las células son liberados de ellas a través de los FcRn. Sin embargo, como los anticuerpos son liberados de las células mientras aún están unidos a los antígenos, dichos anticuerpos no pueden unirse nuevamente a los antígenos. Por ende, de manera similar a los anticuerpos que se unen a los antígenos de membrana, en el caso de los anticuerpos típicos, una molécula de anticuerpo IgG no puede unirse a tres o más moléculas de antígeno.

Los presentes inventores razonaron que, cuando los anticuerpos unidos a los antígenos, por ejemplo, los antígenos de membrana, son tomados en los endosomas por internalización, mientras aún están unidos a los antígenos, son translocados a los lisosomas y son degradados, mientras que los anticuerpos IgG que pudieran disociarse de los antígenos en los endosomas podrían unirse a los FcRn expresados en los endosomas. Específicamente, los presentes inventores descubrieron que un anticuerpo que se uniera fuertemente a un antígeno en el plasma, pero que se uniera débilmente al

antígeno en el endosoma, podría unirse a un antígeno en plasma y ser tomado en los endosomas de las células, en forma de un complejo con el antígeno, por internalización; podría disociarse del antígeno en el endosoma; luego podría unirse al FcRn y sería translocado hasta la superficie de la célula; y regresaría nuevamente al plasma en un estado no unido a los antígenos, para neutralizar múltiples antígenos unidos a membrana. Además, los presentes inventores descubrieron que un anticuerpo que tuviera la propiedad de unirse fuertemente a los antígenos en el plasma, pero que se uniera débilmente a los antígenos en los endosomas, podría disociarse de los antígenos en los endosomas aún cuando el anticuerpo se hubiera unido a antígenos tales como antígenos solubles, por lo que sería liberado nuevamente al plasma en un estado no unido a antígenos, y podría neutralizar múltiples antígenos solubles.

En particular, los presentes inventores observaron que el pH en el plasma era diferente del pH en los endosomas, por lo que descubrieron que los anticuerpos que se unen fuertemente a los antígenos bajo las condiciones de pH del plasma, pero que se unen débilmente a los antígenos bajo las condiciones de pH de los endosomas, eran superiores en términos de retención en plasma, debido a que una molécula de anticuerpo podía unirse a múltiples antígenos.

Los endosomas, que son vesículas de membrana, forman redes en el citoplasma de las células eucariotas, y son responsables del metabolismo de las macromoléculas en el proceso desde la membrana hasta los lisosomas. Se ha informado que el pH en los endosomas generalmente es un pH ácido, de entre 5,5 y 6,0 (Nat Rev Mol Cell Biol. Febrero de 2004;5(2):121-32). Por otro lado, se sabe que el pH en el plasma es prácticamente neutro (normalmente, pH 7,4).

Por lo tanto, una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH ácido es más débil que su actividad de unión al antígeno a pH neutro se une al antígeno en el plasma, que tiene un pH neutro, es tomada por las células, y luego se disocia del antígeno en los endosomas, que tienen un pH ácido. La molécula de unión al antígeno disociada del antígeno se une al FcRn, es translocada hasta la superficie de la célula, y regresa nuevamente al plasma en un estado no unido a antígenos. Como resultado, la molécula de unión al antígeno puede unirse varias veces a los antígenos, con lo que se mejora su farmacocinética.

<Moléculas que son sustancias de unión al antígeno>

Además, en la presente invención se proveen moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a un pH de entre 4,0 y 6,5 es menor que a un pH de entre 6,7 y 10,0, preferiblemente moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a un pH de entre 5,0 y 6,0 es menor que a un pH de entre 7,0 y 8,0. Específicamente, las moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a un pH de entre 4,0 y 6,5 es menor que a un pH de entre 6,7 y 10,0 incluyen, por ejemplo, moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es menor que a pH 7,4. Las moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es menor que a pH 7,4 también pueden describirse como moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 7,4 es mayor que a pH 5,8.

Con relación a las moléculas de unión al antígeno de la presente invención cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es menor que a pH 7,4, siempre que la actividad de unión al antígeno a pH 5,8 sea menor que la unión a pH 7,4, no habrá limitaciones para la diferencia en la actividad de unión, y solamente es necesario que la actividad de unión al antígeno a pH 5,8 sea menor, aún ligeramente.

Una realización preferida de una molécula de unión al antígeno de la presente invención cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es menor que a pH 7,4 incluye moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 7,4 es el doble o más de su actividad a pH 5,8. Una realización más preferida de la molécula de unión al antígeno incluye moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 7,4 es diez veces o más su actividad a pH 5,8. Una realización aún más preferida de la molécula de unión al antígeno incluye moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 7,4 es 40 veces o más su actividad a pH 5,8.

Específicamente, en una realización preferida, la molécula de unión al antígeno de la presente invención tiene una actividad de unión al antígeno a pH 5,8 que es menor que a pH 7,4, donde el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$, que es la relación entre la KD del antígeno a pH 5,8 y la KD a pH 7,4, es preferiblemente 2 o más, más preferiblemente 10 o más, y aún más preferiblemente 40 o más. El límite superior del valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ no se halla particularmente limitado, y puede ser cualquier valor, por

ejemplo, 400, 1000 ó 10000, siempre que sea posible realizar la producción usando tecnologías conocidas por aquellos entrenados en la técnica.

En otra realización preferida, la molécula de unión al antígeno de la presente invención cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es menor que a pH 7,4 tiene un valor de $k_d(\text{pH } 5,8)/k_d(\text{pH } 7,4)$, que es la relación entre la k_d del antígeno a pH 5,8 y la k_d del antígeno a pH 7,4, que es de 2 o más, más preferiblemente 5 o más, aún más preferiblemente 10 o más, y aún más preferiblemente 30 o más. El límite superior del valor de $KD(\text{pH } 5,8)/KD(\text{pH } 7,4)$ no se halla particularmente limitado, y puede ser cualquier valor, por ejemplo, 50, 100 ó 200, siempre que sea posible realizar la producción usando tecnologías conocidas por aquellos entrenados en la técnica.

Las condiciones distintas del pH para medir la actividad de unión al antígeno pueden ser seleccionadas apropiadamente por aquellos entrenados en la técnica, y las condiciones no se hallan particularmente limitadas. Sin embargo, las mediciones pueden efectuarse, por ejemplo, bajo condiciones de amortiguador MES y 37°C, como se describe en los ejemplos. Además, la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno puede determinarse con métodos conocidos por aquellos entrenados en la técnica, por ejemplo, usando Biacore T100 (GE Healthcare) o semejantes, como se describe en los ejemplos.

Se presume que dicha molécula de unión al antígeno, que se une débilmente a un antígeno a pH ácido, se disocia fácilmente del antígeno bajo la condición ácida del endosoma, y que, una vez internalizada en las células, se une al FcRn y es liberada fácilmente de las células. La molécula de unión al antígeno que es liberada de las células sin haber sido degradada dentro de ellas puede unirse nuevamente a otros antígenos. Por lo tanto, cuando la molécula de unión al antígeno es, por ejemplo, una molécula de unión al antígeno neutralizadora, la molécula de unión al antígeno que se disocia fácilmente del antígeno bajo la condición ácida del endosoma puede unirse y neutralizar antígenos varias veces. Como resultado, las moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a un pH de entre 4,0 y 6,5 es menor que a un pH de entre 6,7 y 10,0 son superiores en términos de retención en plasma.

En una realización preferida, la molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es menor que a pH 7,4 incluye moléculas de unión al

antígeno donde se ha sustituido al menos un aminoácido en la molécula de unión al antígeno por histidina o un aminoácido no natural, o donde se ha insertado al menos una histidina o un aminoácido no natural. El sitio donde se introduce la mutación por histidina o un aminoácido no natural no se halla particularmente limitado y puede ser cualquier sitio, siempre y cuando la actividad de unión al antígeno a pH 5,8 sea más débil que a pH 7,4 (el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ es de mayor, o el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ es de mayor), en comparación con la situación previa a la sustitución. Los ejemplos incluirán las regiones variables y las CDR de un anticuerpo, en el caso en que la molécula de unión al antígeno sea un anticuerpo. La cantidad de aminoácidos a sustituir por histidina o aminoácidos no naturales, y la cantidad de aminoácidos a insertar podrán ser determinadas apropiadamente por aquellos entrenados en la técnica. Puede sustituirse un aminoácido por histidina o un aminoácido no natural, o puede insertarse un aminoácido, o pueden sustituirse dos o más aminoácidos por histidina o aminoácidos no naturales, o pueden insertarse dos o más aminoácidos. Más aún, aparte de las sustituciones por histidina o aminoácidos no naturales, o la inserción de histidina o aminoácidos no naturales, también puede efectuarse de manera simultánea la supresión, la adición, la inserción y/o la sustitución de otros aminoácidos, y procedimientos semejantes. Las sustituciones por histidina o un aminoácido no natural, o la inserción de histidina o un aminoácido no natural pueden efectuarse al azar, usando un método como la búsqueda de histidina, donde, en un análisis de alanina conocido por aquellos entrenados en la técnica, se usa histidina en lugar de alanina. Como alternativa, las moléculas de unión al antígeno cuyo valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ es mayor, en comparación con la situación previa a la mutación, pueden seleccionarse entre una biblioteca de moléculas de unión al antígeno donde se han introducido mutaciones por histidina o inserciones de histidina al azar.

Las moléculas de unión al antígeno preferidas con mutaciones por histidina o aminoácidos no naturales, cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es menor que a pH 7,4, incluyen, por ejemplo, moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 7,4 después de la mutación por histidina o un aminoácido no natural es equivalente a la actividad de unión al antígeno a pH 7,4, previa a la mutación por histidina o un aminoácido no natural. En la presente invención, "una molécula de unión al

antígeno, después de una mutación por histidina o un aminoácido no natural, tiene una actividad de unión al antígeno que es equivalente a la de la molécula de unión al antígeno antes de la mutación por histidina o un aminoácido no natural" denota que, cuando la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno antes de la mutación por histidina o un aminoácido no natural se toma como 100%, la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno después de la mutación por histidina o un aminoácido no natural es al menos 10% o más, preferiblemente 50% o más, más preferiblemente 80% o más, y aún más preferiblemente 90% o más. La actividad de unión al antígeno a pH 7,4 después de la mutación por histidina o un aminoácido no natural puede ser mayor que la actividad de unión al antígeno a pH 7,4, antes de la mutación por histidina o un aminoácido no natural. Cuando la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno se reduce debido a la sustitución o la inserción de histidina o aminoácido no natural, la actividad de unión al antígeno puede ajustarse introduciendo una sustitución, una supresión, una adición y/o una inserción de uno o más aminoácidos en la molécula de unión al antígeno, o con procedimientos semejantes, de manera que la actividad de unión al antígeno sea equivalente a la que presentaba antes de la sustitución por histidina o la inserción de histidina. En la presente invención también se incluyen moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión se ha tornado equivalente como resultado de una sustitución, una supresión, una adición y/o una inserción de uno o más aminoácidos, después de la sustitución por histidina o la inserción de histidina.

Además, cuando la molécula de unión al antígeno es una sustancia que incluye una región constante de anticuerpo, en otra realización preferida de la molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es menor que a pH 7,4, en la presente invención se incluyen métodos para modificar las regiones constantes de anticuerpos contenidas en las moléculas de unión al antígeno. Los ejemplos específicos de regiones constantes de anticuerpos después de la modificación incluyen las regiones constantes que se describen en los ejemplos.

Cuando la actividad de unión al antígeno de la sustancia de unión al antígeno a pH 5,8 es más débil que la actividad a pH 7,4 (cuando el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ es de mayor) debido al uso de los métodos descritos con anterioridad, y métodos

semejantes, generalmente es preferible que el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ sea el doble o más, más preferiblemente el quintuple o más, y aún más preferiblemente diez veces o más, en comparación con el del anticuerpo original, pero no se halla particularmente limitado a lo anterior.

Adicionalmente, las moléculas de unión al antígeno de la presente invención pueden tener otra propiedad, siempre que su actividad de unión al antígeno a un pH de entre 4,0 y 6,5 sea menor que a un pH de entre 6,7 y 10,0. Por ejemplo, las moléculas de unión al antígeno pueden ser moléculas de unión al antígeno agónicas o antagónicas. Las moléculas de unión al antígeno preferidas de la presente invención incluyen, por ejemplo, moléculas de unión al antígeno antagónicas. En general, una molécula de unión al antígeno antagónica inhibe la señalización intracelular mediada por receptores al inhibir la unión entre un ligando (agonista) y el receptor.

Además, en la presente invención se proveen anticuerpos donde un aminoácido en al menos un sitio que se detallará más adelante ha sido sustituido por histidina o un aminoácido no natural. Las posiciones de aminoácidos se indican sobre la base de la numeración de Kabat (Kabat EA *et al.*, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, NIH).

Cadena pesada: H27, H31, H32, H33, H35, H50, H58, H59, H61, H62, H63, H64, H65, H99, H100b y H102

Cadena liviana: L24, L27, L28, L32, L53, L54, L56, L90, L92 y L94

Entre los sitios anteriores, H32, H61, L53, L90, y L94 podrían ser sitios de modificación universales.

Cuando el antígeno es el receptor de IL-6 (por ejemplo, el receptor de IL-6 humano), los sitios preferibles para la modificación incluyen los que se indicarán más adelante. Sin embargo, los sitios para la modificación no se hallan particularmente limitados a los indicados.

Cadena pesada: H27, H31, H32, H35, H50, H58, H61, H62, H63, H64, H65, H100b y H102

Cadena liviana: L24, L27, L28, L32, L53, L56, L90, L92 y L94

Cuando se realiza una sustitución por histidina o un aminoácido no natural en varios sitios, las combinaciones preferidas de sitios de sustitución incluyen, por ejemplo,

la combinación de H27, H31 y H35; la combinación de H27, H31, H32, H35, H58, H62 y H102; la combinación de L32 y L53; y la combinación de L28, L32 y L53. Además, las combinaciones preferidas de sitios de sustitución de las cadenas pesada y liviana incluyen las combinaciones de H27, H31, L32, y L53.

Cuando el antígeno es IL-6 (por ejemplo, IL-6 humana), los sitios preferibles para la modificación incluyen los que se indicarán más adelante. Sin embargo, los sitios para la modificación no se hallan particularmente limitados a los indicados.

Cadena pesada: H32, H59, H61 y H99

Cadena liviana: L53, L54, L90 y L94

Cuando el antígeno es el receptor de IL-31 (por ejemplo, el receptor de IL-31 humano), los sitios preferibles para la modificación incluyen H33. Sin embargo, los sitios para la modificación no se hallan particularmente limitados a los indicados.

Las moléculas de unión al antígeno de la presente invención pueden reconocer cualquier antígeno. Los antígenos reconocidos por los anticuerpos de la presente invención específicamente incluyen las proteínas receptoras mencionadas con anterioridad (receptoras unidos a membrana o receptores solubles), antígenos de membrana, tales como marcadores de la superficie celular, y antígenos solubles, tales como citoquinas, por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-31, IL-23, el receptor de IL-2, el receptor de IL-6, el receptor de OSM, gp130, el receptor de IL-5, CD40, CD4, Fas, la osteopontina, CRTH2, CD26, PDGF-D, CD20, el factor quimiotáctico de los monocitos, CD23, TNF- α , HMGB-1, la integrina α 4, ICAM-1, CCR2, CD11a, CD3, IFN γ , BLyS, HLA-DR, TGF- β y CD52.

Los antígenos particularmente preferidos incluyen el receptor de IL-6.

Las moléculas de unión al antígeno de la presente invención han sido descritas con anterioridad.

En una realización preferida de la presente invención, las moléculas de unión al antígeno incluyen anticuerpos. Los anticuerpos que presentan actividad de unión al antígeno y una región capaz de unirse a FcRn incluyen, por ejemplo, anticuerpos IgG. Cuando el anticuerpo usado es un anticuerpo IgG, no hay limitaciones para su tipo. Es posible usar IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y semejantes

El origen del anticuerpo de la presente invención no se halla particularmente limitado, y dicho anticuerpo puede ser de cualquier origen. Es posible usar, por ejemplo, anticuerpos de ratón, anticuerpos humanos, anticuerpos de rata, anticuerpos de conejo, anticuerpos de cabra, anticuerpos de camello, y otros. Además, los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, los anticuerpos quiméricos descritos con anterioridad, y en particular, anticuerpos modificados con sustituciones en su secuencia, tales como anticuerpos humanizados. Los anticuerpos también pueden ser los anticuerpos biespecíficos descritos con anterioridad, productos de la modificación de anticuerpos a los que se les han unido diversas moléculas, polipéptidos, incluyendo fragmentos de anticuerpos, y anticuerpos con cadenas de azúcares modificadas.

Es conocida la generación de anticuerpos quiméricos. En el caso de un anticuerpo quimérico de ser humano-ratón, por ejemplo, puede unirse un ADN que codifica una región V de un anticuerpo y un ADN que codifica una región C de un anticuerpo humano, y el conjunto puede insertarse en un vector de expresión e introducirse en un huésped para producir el anticuerpo quimérico.

Los "anticuerpos humanizados" también se conocen como anticuerpos humanos reformados, y son anticuerpos donde se han transplantado las regiones de determinación de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano, por ejemplo, un ratón, dentro de las CDR de un anticuerpo humano. Se conocen métodos para identificar las CDR (Kabat *et al.*, Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; Chotia *et al.*, Nature (1989) 342:877). También se conocen tecnologías generales de recombinación genética apropiadas para este propósito (véanse la Solicitud de Patente Europea EP 125023 y WO 96/02576). Los anticuerpos humanizados pueden producirse con métodos conocidos, por ejemplo, puede determinarse la CDR de un anticuerpo de ratón, y puede unirse un ADN que codifica un anticuerpo, de manera de obtener la CDR unida en la región de marco (FR) de un anticuerpo humano. Después, los anticuerpos humanizados pueden producirse usando un sistema donde se usen vectores de expresión convencionales. Estos ADN pueden sintetizarse por PCR, usando como cebadores diversos oligonucleótidos preparados de manera que presenten porciones que se superpongan con los extremos de las CDR y las FR (véase el método que se

describe en WO 98/13388). Se seleccionan FR de anticuerpos humanos unidas a través de CDR, de manera que las CDR formen un sitio de unión al antígeno apropiado. De ser necesario, pueden sustituirse aminoácidos en las FR de la región variable de un anticuerpo, de manera que las CDR del anticuerpo humano reformado puedan formar un sitio de unión al antígeno apropiado (Sato, K. *et al.*, Cancer Res. (1993) 53:10.01-6). Los residuos de aminoácidos en las FR que pueden modificarse incluyen porciones que se unen directamente a un antígeno a través de enlaces no covalentes (Amit *et al.*, Science (1986) 233: 747-53), porciones que influyen o tienen un efecto sobre la estructura de la CDR (Chotia *et al.*, J. Mol. Biol. (1987) 196: 901-17) y porciones que participan en las interacciones VH-VL (EP 239400).

Cuando los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados, las regiones C de estos anticuerpos preferiblemente derivan de anticuerpos humanos. Por ejemplo, puede usarse C γ 1, C γ 2, C γ 3 y C γ 4 para la cadena H, y puede usarse C κ y C λ para la cadena L. Más aún, de ser necesario, pueden introducirse mutaciones de aminoácidos en la región C del anticuerpo humano para incrementar o disminuir la unión al receptor de Fc γ o FcRn, o para mejorar la estabilidad o la productividad del anticuerpo. Un anticuerpo quimérico de la presente invención preferiblemente incluye una región variable de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano y una región constante derivada de un anticuerpo humano. Por otro lado, un anticuerpo humanizado preferiblemente incluye CDR de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano y FR y regiones C derivadas de un anticuerpo humano. Las regiones constantes derivadas de anticuerpos humanos preferiblemente incluyen una región capaz de unirse a FcRn. Estos anticuerpos incluyen, por ejemplo, IgGs (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Las regiones constantes usadas para los anticuerpos humanizados de la presente invención pueden ser regiones constantes de anticuerpos de cualquier isotipo. Preferiblemente, pero sin limitaciones, se usa una región constante de IgG humana. Las FR derivadas de un anticuerpo humano que se usan para los anticuerpos humanizados tampoco se hallan particularmente limitadas, y pueden derivar de un anticuerpo de cualquier isotipo.

Las regiones variables y constantes de los anticuerpos quiméricos y humanizados de la presente invención pueden modificarse mediante la supresión, la

sustitución, la inserción y/o la adición de aminoácidos, y por medio de otros procedimientos semejantes, siempre que los productos presenten la especificidad de unión de los anticuerpos originales.

Como se reduce la inmunogenicidad en el cuerpo humano, se cree que los anticuerpos quiméricos y humanizados donde se usan secuencias derivadas de seres humanos son útiles para administrarlos a seres humanos con fines terapéuticos o propósitos semejantes.

Los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse con cualquier método. Por ejemplo, los anticuerpos cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es originalmente mayor o comparable a su actividad a pH 7,4 pueden modificarse por medios artificiales, mediante la sustitución por histidina descrita con anterioridad, o con procedimientos semejantes, de manera de que su actividad de unión al antígeno a pH 5,8 se torne más baja que a pH 7,4. Como alternativa, pueden seleccionarse anticuerpos cuya actividad de unión al antígeno a pH 5,8 es menor que a pH 7,4 realizando una búsqueda entre una cantidad de anticuerpos obtenidos de una biblioteca de anticuerpos o hibridomas, como se describirá más adelante.

Cuando se sustituyen aminoácidos por histidina en un anticuerpo, pueden usarse secuencias conocidas para la secuencia de aminoácidos de la cadena H o la cadena L del anticuerpo, antes de la introducción de las mutaciones por histidina, o también pueden usarse secuencias de aminoácidos de anticuerpos obtenidos recientemente de acuerdo con métodos conocidos por aquellos entrenados en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden obtenerse a partir de una biblioteca de anticuerpos, o pueden obtenerse clonando genes que codifican anticuerpos a partir de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales.

Con relación a las bibliotecas de anticuerpos, ya se conocen varias bibliotecas de anticuerpos, y también se conocen métodos para producir bibliotecas de anticuerpos. Por ende, aquellos entrenados en la técnica pueden obtener apropiadamente bibliotecas de anticuerpos. Por ejemplo, con relación las bibliotecas de anticuerpos en fagos, puede consultarse la literatura, por ejemplo, Clackson *et al.*, Nature 1991, 352: 624-8; Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 1991, 222: 581-97; Waterhouses *et al.*, Nucleic Acids Res. 1993, 21: 2265-6; Griffiths *et al.*, EMBO J. 1994, 13: 3240-60;

Vaughan *et al.*, Nature Biotechnology 1996, 14: 309-14; y la Publicación de Patente Japonesa Kohyo N° (JP-A) H20-504970 (publicación japonesa no examinada de fase nacional que corresponde a una publicación internacional no japonesa). Además, es posible usar métodos conocidos, tales como métodos donde se usan células eucariotas como bibliotecas (WO 95/15393) y métodos de presentación en ribosomas. Además, también se conocen tecnologías para obtener anticuerpos humanos por medio de análisis con bibliotecas de anticuerpos humanos. Por ejemplo, las regiones variables de los anticuerpos humanos pueden expresarse en la superficie de fagos como anticuerpos de cadena simple (scFv) usando métodos de presentación en fagos, y pueden seleccionarse los fagos que se unen a los antígenos. Con el análisis genético de los fagos seleccionados, es posible determinar las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de los anticuerpos humanos que han de unirse a los antígenos. Una vez que se han determinado las secuencias de ADN de los scFv que se unen a los antígenos, pueden producirse vectores de expresión apropiados sobre la base de estas secuencias, para obtener anticuerpos humanos. Estos métodos son bien conocidos, y pueden consultarse en WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 y WO 95/15388.

Con relación a los métodos para obtener genes que codifican anticuerpos a partir de hibridomas, básicamente pueden usarse tecnologías conocidas que comprenden el uso de los antígenos deseados, o células que expresan los antígenos deseados, como antígenos sensibilizadores, para realizar inmunizaciones de acuerdo con métodos de inmunización convencionales, a lo que sigue la fusión de las células inmunes resultantes con células progenitoras conocidas, de acuerdo con métodos de función convencionales, la búsqueda de células productoras de anticuerpos monoclonales (hibridomas) de acuerdo con métodos de búsqueda convencionales, la síntesis de ADNc de regiones variables de anticuerpos (regiones V) a partir de ARNm de los hibridomas obtenidos usando transcriptasa inversa, y la unión de dicho ADNc con ADN que codifica las regiones constantes deseadas de los anticuerpos (regiones C).

Más específicamente, los antígenos sensibilizadores para obtener los genes de anticuerpos descritos con anterioridad, que codifican las cadenas H y las cadenas L, incluyen antígenos completos con inmunogenicidad y antígenos incompletos, incluyendo

haptenos y semejantes, sin antigenicidad. Sin embargo, los antígenos sensibilizadores no se limitan a estos ejemplos. Por ejemplo, es posible usar proteínas completas y péptidos parciales de interés. Además, se sabe que las sustancias que comprenden polisacáridos, los ácidos nucleicos, los lípidos, y sustancias semejantes, pueden actuar como antígenos. Por lo tanto, los antígenos de los anticuerpos de la presente invención no se hallan particularmente limitados. Los antígenos pueden prepararse con métodos conocidos por aquellos entrenados en la técnica, por ejemplo, con métodos basados en baculovirus (por ejemplo, WO 98/46777), y semejantes. Los hibridomas pueden producirse, por ejemplo, con el método de Milstein *et al.* (G. Kohler y C. Milstein, *Methods Enzymol.* 1981, 73: 3-46), y semejantes. Cuando la inmunogenicidad de un antígeno sea baja, la inmunización podrá realizarse después de unir el antígeno con una macromolécula que presente inmunogenicidad, tal como la albúmina. Como alternativa, de ser necesario, los antígenos pueden ser convertidos en antígenos solubles al unirlos con otras moléculas. Cuando como antígenos se usan moléculas transmembrana, tales como antígenos de membrana (por ejemplo, receptores), pueden usarse porciones de las regiones extracelulares de los antígenos de membrana como fragmentos, o pueden usarse células en cuya superficie se expresan las moléculas transmembrana como inmunógenos.

Las células productoras de anticuerpos pueden obtenerse inmunizando los animales con antígenos sensibilizadores apropiados, como se describió con anterioridad. Como alternativa, las células productoras de anticuerpos pueden prepararse mediante la inmunización *in vitro* de linfocitos que pueden producir anticuerpos. Pueden usarse diversos mamíferos para la inmunización. Los animales de uso común incluyen roedores, lagomorfos y primates. Estos animales incluyen, por ejemplo, roedores, tales como ratones, ratas y hámsteres; lagomorfos, tales como conejos; y primates, incluyendo monos, tales como monos macacos, monos rhesus, mandriles y chimpancés. Además, también se conocen los animales transgénicos que contienen repertorios de anticuerpos humanos, y pueden obtenerse anticuerpos humanos usando estos animales (véanse WO 96/34096; Mendez *et al.*, *Nat. Genet.* 1997, 15: 146-56). En lugar del uso de estos animales transgénicos, por ejemplo, los anticuerpos humanos que presentan actividad de unión a los antígenos deseados pueden obtenerse mediante la sensibilización *in vitro*

de linfocitos humanos con los antígenos deseados, o con células que expresan los antígenos deseados, a lo que sigue la fusión de los linfocitos sensibilizados con células de mieloma mieloma, tales como U266 (véase la Publicación de Solicitud de Patente Japonesa Kokoku N° (JP-B) H01-59878 (solicitud de patente japonesa aprobada, publicada para oposición)). Además, los anticuerpos humanos deseados pueden obtenerse inmunizando con los antígenos deseados animales transgénicos que contienen un repertorio completo de genes de anticuerpos humanos (véanse WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 96/34096 y WO 96/33735).

La inmunización de los animales puede efectuarse diluyendo y suspendiendo apropiadamente un antígeno sensibilizador en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica, o semejantes, y realizando una mezcla con un coadyuvante para producir una emulsión, de ser necesario. Posteriormente, se realizar una inyección intraperitoneal o subcutánea en los animales. Luego, preferiblemente se administra el antígeno sensibilizador, mezclado con coadyuvante incompleto de Freund, en varias ocasiones durante un período de entre cuatro y 21 días. La producción de anticuerpos puede confirmarse midiendo la titulación del anticuerpo de interés en suero del animal, usando métodos convencionales.

Las células productoras de anticuerpos obtenidas a partir de linfocitos o animales inmunizados con un antígeno deseado pueden fusionarse con células de mieloma para generar hibridomas, mediante el uso de agentes de fusión convencionales (por ejemplo, polietilenglicol) (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986, 59-103). Cuando sea necesario, las células de hibridomas podrán ser cultivadas y desarrolladas, y será posible medir la especificidad de unión del anticuerpo producido por estos hibridomas usando métodos de análisis conocidos, tales como la inmunoprecipitación, el radioinmunoensayo (RIA) y el ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA). Después, los hibridomas productores de anticuerpos de interés cuya especificidad, afinidad o actividad haya sido determinada podrán ser subclonados con métodos tales como la dilución limitativa.

Posteriormente, los genes que codifican los anticuerpos seleccionados podrán clonarse a partir de hibridomas o células productoras de anticuerpos (linfocitos sensibilizados, y semejantes), usando sondas que puedan unirse específicamente a los

anticuerpos (por ejemplo, oligonucleótidos complementarios con las secuencias que codifican las regiones constantes de los anticuerpos). También es posible clonar los genes a partir de ARNm usando RT-PCR. Las inmunoglobulinas se clasifican en cinco clases diferentes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. A su vez, estas clases son divididas en diversas subclases (isotipos) (por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3 e IgG-4, IgA-1 e IgA-2, y semejantes). Las cadenas H y las cadenas L usadas en la presente invención para producir anticuerpos no se hallan particularmente limitadas, y pueden originarse en anticuerpos que pertenecen a cualquiera de estas clases o subclases. Sin embargo, en particular se prefiere la IgG.

En la presente documentación, es posible modificar los genes que codifican la cadena H y los genes que codifican la cadena L usando tecnologías de ingeniería genética. Los anticuerpos modificados genéticamente, tales como los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos humanizados, que han sido modificados por medios artificiales con el fin de reducir su inmunogenicidad heteróloga y efectos semejantes contra los seres humanos, pueden producirse apropiadamente a partir de anticuerpos tales como anticuerpos de ratón, anticuerpos de rata, anticuerpos de conejo, anticuerpos de hámster, anticuerpos de oveja y anticuerpos de camello. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos que incluyen las regiones variables de la cadena H y la cadena L de un anticuerpo de un mamífero no humano, tal como un anticuerpo de ratón, y las regiones constantes de la cadena H y la cadena L de un anticuerpo humano. Los anticuerpos quiméricos pueden obtenerse uniendo un ADN que codifica la región variable de un anticuerpo de ratón con ADN que codifica la región constante de un anticuerpo humano, insertando el conjunto en un vector de expresión, e introduciendo el vector en un huésped para producir el anticuerpo. Un anticuerpo humanizado, también denominado anticuerpo humano reformado, puede sintetizarse por PCR a partir de una cantidad de oligonucleótidos producidos de manera que presenten porciones que se superpongan con los extremos de las secuencias de ADN diseñadas para unir las regiones de determinación de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo de un mamífero no humano, tal como el ratón. El ADN resultante puede unirse a un ADN que codifica la región constante de un anticuerpo humano. El ADN puede insertarse en un vector de expresión, y el vector puede introducirse en un huésped para producir el anticuerpo

(véanse EP 239400 y WO 96/02576). Las FR de anticuerpos humanos que están unidas a través de las CDR se seleccionan cuando la CDR forma un sitio de unión al antígeno favorable. De ser necesario, pueden sustituirse aminoácidos en la región de marco de la región variable del anticuerpo, de modo que la CDR del anticuerpo humano reformado forme un sitio de unión al antígeno apropiado (K. Sato *et al.*, Cancer Res. 1993, 53: 10.01-10.06).

Además de la humanización descrita con anterioridad, los anticuerpos pueden modificarse para mejorar sus propiedades biológicas, por ejemplo, la unión al antígeno. En la presente invención, estas modificaciones pueden efectuarse de acuerdo con métodos como la mutagénesis dirigida a sitios específicos (véase, por ejemplo, Kunkel (1910.0) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488), la mutagénesis por PCR y la mutagénesis con cassette. En general, los anticuerpos mutantes cuyas propiedades biológicas han sido mejoradas presentan una homología y/o una similitud a nivel de su secuencia de aminoácidos de 70% o más, más preferiblemente 80% o más, y aún más preferiblemente 90% o más (por ejemplo, 95% o más, 97%, 98% o 99%), cuando se los compara con la secuencia de aminoácidos de la región variable del anticuerpo original. En la presente documentación, la homología y/o la similitud de secuencia se define como la relación entre los residuos de aminoácidos que son homólogos (residuos iguales) o similares (residuos de aminoácidos clasificados en el mismo grupo, sobre la base de las propiedades generales de las cadenas laterales de los aminoácidos) a los residuos del anticuerpo original, una vez que se ha maximizado el valor de homología de secuencia mediante el alineamiento de las secuencias y la introducción de faltas de coincidencia, de ser necesario. En general, los residuos de aminoácidos naturales se clasifican en grupos sobre la base de las características de sus cadenas laterales, como se indica a continuación:

- (1) hidrofóbicos: alanina, isoleucina, valina, metionina y leucina;
- (2) hidrofílicos neutros: asparragina, glutamina, cisteína, treonina y serina;
- (3) ácidos: ácido aspártico y ácido glutámico;
- (4) básicos: arginina, histidina y lisina;
- (5) residuos que afectan la orientación de la cadena: glicina y prolina; y
- (6) aromáticos: tirosina, triptofano y fenilalanina.

En general, en total hay seis regiones de determinación de la complementariedad (CDR, regiones hipervariables) presentes en las regiones variables de la cadena H y la cadena L, las cuales interactúan unas con otras para formar el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo. También se sabe que una región variable sola puede reconocer y unirse a un antígeno, aunque su afinidad es menor que la afinidad del sitio de unión completo. Por consiguiente, los genes de anticuerpos que codifican la cadena H y la cadena L de la presente invención pueden codificar fragmentos, cada uno de los cuales podrá incluir la cadena H o la cadena L del sitio unión al antígeno, siempre y cuando el polipéptido codificado por el gen retenga la actividad de unión al antígeno deseado.

Como se describió con anterioridad, la región variable de la cadena pesada generalmente está compuesta por tres CDR y cuatro FR. En una realización preferida de la presente invención, los residuos de aminoácidos a “modificar” pueden seleccionarse apropiadamente, por ejemplo, entre residuos de aminoácidos en una CDR o una FR. En general, las modificaciones de los residuos de aminoácidos en las CDR pueden reducir la capacidad de unión al antígeno. Por lo tanto, los residuos de aminoácidos apropiados para la “modificación” de acuerdo con la presente invención preferiblemente se seleccionan, sin limitaciones, entre residuos de aminoácidos en las FR. Es posible seleccionar aminoácidos en una CDR siempre y cuando se haya confirmado que la modificación no reducirá la capacidad de unión. Como alternativa, mediante el uso de bases de datos públicas o elementos semejantes, aquellos entrenados en la técnica pueden obtener secuencias que pueden usarse como la FR de la región variable de un anticuerpo de un organismo, tal como un ser humano o un ratón.

Además, en la presente invención se proveen genes que codifican los anticuerpos de la presente invención. Los genes que codifican los anticuerpos de la presente invención pueden ser cualquier gen, y pueden ser ADN, ARN, análogos de ácidos nucleicos, o semejantes.

Adicionalmente, en la presente invención también se proveen células huésped que contienen los genes descritos con anterioridad. Las células huésped no se hallan particularmente limitadas, e incluyen, por ejemplo, *E. coli* y diversas células. Las células huésped pueden usarse, por ejemplo, como un sistema de producción para producir y

expresar los anticuerpos de la presente invención. Hay sistemas de producción *in vitro* e *in vivo* disponibles para la producción de polipéptidos. Los sistemas de producción *in vitro* incluyen, por ejemplo, sistemas de producción donde se usan células eucariotas o células procariotas.

Las células eucariotas que pueden usarse como células huésped incluyen, por ejemplo, células animales, células vegetales y células fúngicas. Las células animales incluyen células de mamíferos, por ejemplo, CHO (J. Exp. Med. (1995) 108: 94.0), COS, HEK293, 3T3, mieloma, BHK (riñón de hámster bebé), HeLa y Vero; células de anfibios, tales como oocitos de *Xenopus laevis* (Valle *et al.*, Nature (1981) 291: 338-340); y células de insectos, tales como Sf9, Sf21 y Tn5. Preferiblemente, se usan las células CHO-DG44, CHO-DX11B, COS7, HEK293 y BHK para expresar los anticuerpos de la presente invención. Entre las células animales, las células CHO son particularmente preferibles para la expresión a gran escala. Los vectores pueden introducirse en las células huésped, por ejemplo, con métodos mediados por fosfato de calcio, métodos mediados por DEAE-dextrano, métodos donde se usa un liposoma catiónico DOTAP (Boehringer-Mannheim), métodos de electroporación y métodos de lipofección.

Con relación a las células vegetales, por ejemplo, se conocen las células derivadas de *Nicotiana tabacum* y lenteja de agua (*Lemna minor*) como sistemas de producción de proteínas. Es posible cultivar callos a partir de estas células para producir los anticuerpos de la presente invención. Con relación a las células fúngicas, los sistemas de expresión de proteínas conocidos son aquellos donde se usan células de levadura, por ejemplo, células del género *Saccharomyces* (tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pombe*); y células de hongos filamentosos, por ejemplo, del género *Aspergillus* (tales como *Aspergillus niger*). Estas células pueden usarse como huéspedes para producir los anticuerpos de la presente invención.

En los sistemas de producción procariotas pueden usarse células bacterianas. Con relación a las células bacterianas, se conocen los sistemas de producción donde se usa *Bacillus subtilis*, además de los sistemas de producción donde se usa *E. coli* que se describieron con anterioridad. Estos sistemas pueden usarse para producir los anticuerpos de la presente invención.

<Métodos de búsqueda>

En la presente invención se proveen métodos para buscar moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a pH ácido es menor que a pH neutro. En la presente invención también se proveen métodos para buscar moléculas de unión al antígeno que pueden unirse individualmente a múltiples antígenos. En la presente invención también se proveen métodos para buscar moléculas de unión al antígeno que son superiores en términos de retención en plasma. En la presente invención también se proveen métodos para buscar una molécula de unión al antígeno que se disocia de en una célula de un antígeno unido desde el exterior de la célula. En la presente invención también se proveen métodos para buscar una molécula de unión al antígeno que está unida a un antígeno y ha sido internalizada en una célula, y que luego ha sido liberada de la célula en una forma libre de antígeno. En la presente invención también se proveen métodos para buscar una molécula de unión al antígeno que presenta una capacidad mejorada de eliminar antígenos en plasma. Además, en la presente invención también se proveen métodos para buscar moléculas de unión al antígeno que son particularmente útiles cuando se las formula como composiciones farmacéuticas.

Específicamente, en la presente invención se proveen métodos para buscar moléculas de unión al antígeno, que comprenden los siguientes pasos:

- (a) determinar la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a un pH de entre 6,7 y 10,0;
- (b) determinar la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a un pH de entre 4,0 y 6,5; y
- (c) seleccionar una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a un pH de entre 6,7 y 10,0 es mayor que su actividad de unión al antígeno a un pH de entre 4,0 y 6,5.

En los métodos de búsqueda de la presente invención, la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a un pH de entre 6,7 y 10,0 no se halla particularmente limitada, siempre y cuando se trate de una actividad de unión al antígeno a un pH de entre 6,7 y 10,0. Sin embargo, por ejemplo, una actividad de unión al antígeno preferida es una actividad de unión al antígeno a un pH de entre 7,0 y 8,0, y una actividad de unión al antígeno más preferida es una actividad de unión al antígeno a pH 7,4. Además, la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a

un pH de entre 4,0 y 6,5 no se halla particularmente limitada, siempre y cuando sea una actividad de unión al antígeno a un pH de entre 4,0 y 6,5. Sin embargo, por ejemplo, una actividad de unión al antígeno preferida es una actividad de unión al antígeno a un pH de entre 5,5 y 6,5, y una actividad de unión al antígeno más preferida es una actividad de unión al antígeno a pH 5,8 o pH 5,5.

La actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno puede determinarse con métodos conocidos por aquellos entrenados en la técnica. Las condiciones distintas del pH antígeno pueden ser determinadas apropiadamente por aquellos entrenados en la técnica. La actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno puede determinarse como la constante de disociación (K_D), la constante de disociación aparente (K_D aparente), la velocidad de disociación (k_d), la velocidad de disociación aparente (k_d aparente), o semejantes. Estas constantes pueden determinarse con métodos conocidos por aquellos entrenados en la técnica, por ejemplo, usando Biacore (GE healthcare), Scatchard plot o FACS.

En la presente documentación, “el paso de selección de una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a un pH de entre 6,7 y 10,0 es mayor que a un pH de entre 4,0 y 6,5” tiene el mismo significado que “el paso de selección de una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a un pH de entre 4,0 y 6,5 es menor que a un pH de entre 6,7 y 10,0”

La diferencia entre la actividad de unión al antígeno a un pH de entre 6,7 y 10,0 y la actividad a un pH de entre 4,0 y 6,5 no se halla particularmente limitada, siempre y cuando la actividad de unión al antígeno a un pH de entre 6,7 y 10,0 sea mayor que a un pH de entre 4,0 y 6,5. Sin embargo, la actividad de unión al antígeno a un pH de entre 6,7 y 10,0 preferiblemente es el doble o más, más preferiblemente diez veces o más, y aún más preferiblemente 40 veces o más que la actividad de unión al antígeno a un pH de entre 4,0 y 6,5.

Además, en la presente invención también se proveen métodos para buscar moléculas de unión al antígeno, que comprenden los siguientes pasos:

(a) unir una molécula de unión al antígeno a un antígeno bajo una condición con un pH de entre 6,7 y 10,0;

(b) colocar la molécula de unión al antígeno unida al antígeno de (a) bajo una condición con un pH de entre 4,0 y 6,5; y

(c) obtener la molécula de unión al antígeno disociada bajo una condición con un pH de entre 4,0 y 6,5.

Además, en la presente invención también se proveen métodos para buscar moléculas de unión al antígeno, que comprenden los siguientes pasos:

(a) seleccionar una molécula de unión al antígeno que no se une a un antígeno bajo una condición con un pH de entre 4,0 y 6,5;

(b) unir la molécula de unión al antígeno seleccionada en (a) a un antígeno bajo una condición con un pH de entre 6,7 y 10,0; y

(c) obtener la molécula de unión al antígeno que se ha unido al antígeno bajo la condición con un pH de entre 6,7 y 10,0.

Además, en la presente invención también se proveen métodos para buscar moléculas de unión al antígeno, que comprenden los siguientes pasos:

(a) unir una molécula de unión al antígeno a un antígeno bajo una condición con un pH de entre 6,7 y 10,0;

(b) colocar la molécula de unión al antígeno unida al antígeno de (a) bajo una condición con un pH de entre 4,0 y 6,5;

(c) obtener la molécula de unión al antígeno disociada bajo una condición con un pH de entre 4,0 y 6,5;

(d) amplificar el gen que codifica la molécula de unión al antígeno que se ha disociado; y

(e) obtener la molécula de unión al antígeno eluida.

Los pasos (a) a (d) pueden repetirse dos o más veces. Por ende, en la presente invención se proveen los métodos que se describieron con anterioridad, los cuales también incluyen el paso de repetir los pasos (a) a (d) dos o más veces. La cantidad de repeticiones de los pasos (a) a (d) no se halla particularmente limitada. Sin embargo, la cantidad generalmente es diez o menos.

Además, en la presente invención también se proveen métodos para buscar moléculas de unión al antígeno, que comprenden los siguientes pasos:

(a) seleccionar una molécula de unión al antígeno que no se une a un antígeno bajo una condición con un pH de entre 4,0 y 6,5;

- (b) unir la molécula de unión al antígeno seleccionada en (a) a un antígeno bajo una condición con un pH de entre 6,7 y 10,0;
- (c) obtener la molécula de unión al antígeno que se ha unido al antígeno bajo la condición con un pH de entre 6,7 y 10,0;
- (d) amplificar el gen que codifica la molécula de unión al antígeno que se ha disociado; y
- (e) recolectar la molécula de unión al antígeno eluida.

Los pasos (a) a (d) pueden repetirse dos o más veces. Por ende, en la presente invención se proveen los métodos que se describieron con anterioridad, los cuales también incluyen el paso de repetir los pasos (a) a (d) dos o más veces. La cantidad de repeticiones de los pasos (a) a (d) no se halla particularmente limitada. Sin embargo, la cantidad generalmente es diez o menos.

Cuando se usa una biblioteca de fagos o elementos semejantes en los métodos de búsqueda de la presente invención, el paso de amplificación del gen que codifica la molécula de unión al antígeno también puede ser un paso de amplificación de fagos.

En los métodos de la presente invención, la unión de la molécula de unión al antígeno y el antígeno puede efectuarse en cualquier estado, sin limitaciones particulares. Por ejemplo, la unión de la molécula de unión al antígeno y el antígeno puede efectuarse poniendo en contacto un antígeno con una molécula de unión al antígeno inmovilizada, o poniendo en contacto una molécula de unión al antígeno con un antígeno inmovilizado. Como alternativa, la unión de la molécula de unión al antígeno y el antígeno puede efectuarse poniendo en contacto el antígeno y la molécula de unión al antígeno en una solución.

Además, en la presente invención también se proveen métodos para buscar moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH es mayor que a un segundo pH, que comprenden los siguientes pasos:

- (a) unir una molécula de unión al antígeno a una columna con un antígeno inmovilizado bajo una condición con el primer pH;
- (b) eluir la molécula de unión al antígeno unida a la columna al primer pH de la columna, bajo una condición con el segundo pH; y
- (c) obtener la molécula de unión al antígeno eluida.

Además, en la presente invención también se proveen métodos para buscar moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH es menor que a un segundo pH, que comprenden los siguientes pasos:

- (a) hacer pasar una molécula de unión al antígeno a través de una columna de antígenos inmovilizados bajo una condición con el primer pH;
- (b) recolectar la molécula de unión al antígeno eluida, que no se unió a la columna en el paso (a);
- (c) unir la molécula de unión al antígeno recolectada en (b) a una columna bajo la condición del segundo pH; y
- (d) obtener la molécula de unión al antígeno unida a la columna en el paso (c).

Además, en la presente invención también se proveen métodos para buscar moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH es mayor que a un segundo pH, que comprenden los siguientes pasos:

- (a) unir una biblioteca de moléculas de unión al antígeno a una columna con un antígeno inmovilizado bajo una condición con el primer pH;
- (b) eluir la molécula de unión al antígeno de la columna bajo una condición con el segundo pH;
- (c) amplificar el gen que codifica la molécula de unión al antígeno eluida; y
- (d) obtener la molécula de unión al antígeno eluida.

Los pasos (a) a (c) pueden repetirse dos o más veces. Por ende, en la presente invención se proveen los métodos que se describieron con anterioridad, los cuales también incluyen el paso de repetir los pasos (a) a (c) dos o más veces. La cantidad de repeticiones de los pasos (a) a (c) no se halla particularmente limitada. Sin embargo, la cantidad generalmente es diez o menos.

En la presente invención, cada uno del primer y el segundo pH puede ser cualquier pH, siempre que no sean idénticos. En una combinación preferida del primer y el segundo pH, por ejemplo, el primer pH es de entre 6,7 y 10,0, y el segundo pH es de entre 4,0 y 6,5; en una combinación más preferida, el primer pH es de entre 7,0 y 8,0, y el segundo pH es de entre 5,5 y 6,5; y en una combinación aún más preferida, el primer pH es 7,4 y el segundo pH es 5,8 ó 5,5.

En otra combinación preferida del primer y el segundo pH, por ejemplo, el primer pH es de entre 4,0 y 6,5, y el segundo pH es de entre 6,7 y 10,0; en una combinación más preferida, el primer pH es de entre 5,5 y 6,5, y el segundo pH es de entre 7,0 y 8,0; y en una combinación aún más preferida, el primer pH es 5,8 ó 5,5 y el segundo pH es 7,4.

Las moléculas de unión al antígeno que se buscan con los métodos de la presente invención pueden ser cualquier molécula de unión al antígeno. Por ejemplo, es posible usar las moléculas de unión al antígeno descritas con anterioridad en la búsqueda de la presente invención. Por ejemplo, es posible buscar moléculas de unión al antígeno que incluyen secuencias naturales o moléculas de unión al antígeno que incluyen secuencias de aminoácidos con sustituciones. Las moléculas de unión al antígeno preferidas que se buscan en la presente invención incluyen, por ejemplo, moléculas de unión al antígeno donde se ha sustituido al menos un aminoácido por histidina o se ha insertado al menos una histidina. El sitio para introducir la sustitución por histidina o la inserción de histidina no se halla particularmente limitado, y puede tratarse de cualquier. Además, la sustitución por histidina o la inserción de histidina pueden introducirse en un sitio, o pueden introducirse en dos o más sitios. Además, las moléculas de unión al antígeno preferidas que se buscan en la presente invención incluyen, por ejemplo, moléculas de unión al antígeno que incluyen regiones constantes de anticuerpos modificadas.

Las moléculas de unión al antígeno que se buscan con los métodos de la presente invención pueden ser una cantidad de moléculas de unión al antígeno diferentes, con la introducción de sustituciones por histidina o inserciones de histidina en distintos sitios, por ejemplo, por medio de una búsqueda de histidina.

Por lo tanto, los métodos de búsqueda de la presente invención también pueden comprender el paso de sustituir al menos un aminoácido en la molécula de unión al antígeno por histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno.

En los métodos de búsqueda de la presente invención, pueden usarse aminoácidos no naturales en lugar de histidina. Entonces, la presente invención también puede ponerse en práctica reemplazando la histidina mencionada con anterioridad por aminoácidos no naturales.

Más aún, los métodos de búsqueda de la presente invención también pueden comprender el paso de modificar los aminoácidos de las regiones constantes de los anticuerpos.

Las sustancias de unión al antígeno que pueden buscarse con los métodos de búsqueda de la presente invención pueden prepararse de acuerdo con cualquier método. Por ejemplo, es posible usar anticuerpos preexistentes, bibliotecas preexistentes (bibliotecas con modificaciones en función del pH, y semejantes), anticuerpos y bibliotecas preparados a partir de hibridomas obtenidos mediante la inmunización de animales o células B de animales inmunizados, anticuerpos y bibliotecas (bibliotecas con un contenido elevado de histidina o aminoácidos no naturales, bibliotecas con introducciones de histidina o aminoácidos no naturales en sitios específicos, y semejantes) preparados introduciendo mutaciones por histidina o mutaciones por aminoácidos no naturales en los anticuerpos y las bibliotecas descritos con anterioridad, y semejantes.

Con los métodos de búsqueda de la presente invención pueden obtenerse moléculas de unión al antígeno que se unen varias veces a los antígenos, por lo que son superiores en términos de retención en plasma. Por ende, los métodos de búsqueda de la presente invención pueden usarse como métodos de búsqueda para obtener moléculas de unión al antígeno que son superiores en términos de retención en plasma.

Además, con los métodos de búsqueda de la presente invención pueden obtenerse moléculas de unión al antígeno que se unen dos o más veces a los antígenos cuando son administradas en animales, tales como seres humanos, ratones o monos. Por consiguiente, los métodos de búsqueda de la presente invención pueden usarse como métodos de búsqueda para obtener moléculas de unión al antígeno que se unen dos o más veces a los antígenos.

Adicionalmente, con los métodos de búsqueda de la presente invención pueden obtenerse moléculas de unión al antígeno que son capaces de unirse a más antígenos, en comparación con la cantidad de sitios de unión al antígeno que poseen, cuando son administradas en animales, tales como seres humanos, ratones o monos. Por lo tanto, los métodos de búsqueda de la presente invención pueden usarse como métodos de búsqueda para obtener moléculas de unión al antígeno que son capaces de unirse a

más antígenos, en comparación con la cantidad de sitios de unión al antígeno que poseen. Por ejemplo, cuando el anticuerpo es un anticuerpo neutralizador, los métodos de búsqueda de la presente invención pueden usarse como métodos de búsqueda para obtener moléculas de unión al antígeno que pueden neutralizar más antígenos, en comparación con la cantidad de sitios de unión al antígeno de las moléculas de unión al antígeno.

Además, con los métodos de búsqueda de la presente invención pueden obtenerse moléculas de unión al antígeno que son capaces de disociarse en una célula de un antígeno unido desde el exterior de la célula cuando son administradas en animales, tales como seres humanos, ratones o monos. Por consiguiente, los métodos de búsqueda de la presente invención pueden usarse como métodos de búsqueda para obtener moléculas de unión al antígeno que son capaces de disociarse en una célula de un antígeno unido desde el exterior de la célula.

Adicionalmente, con los métodos de búsqueda de la presente invención pueden obtenerse moléculas de unión al antígeno que se unen a un antígeno y son internalizadas en una célula, y que luego son liberadas de la célula en una forma libre de antígeno, cuando son administradas en animales, tales como seres humanos, ratones o monos. Por ende, los métodos de búsqueda de la presente invención pueden usarse como métodos de búsqueda para obtener moléculas de unión al antígeno que se unen a un antígeno y son internalizadas en una célula, y que luego son liberadas de la célula en una forma libre de antígeno.

Además, con los métodos de búsqueda de la presente invención pueden obtenerse moléculas de unión al antígeno que permiten eliminar rápidamente los antígenos en plasma cuando son administradas en animales, tales como seres humanos, ratones o monos. Por lo tanto, los métodos de búsqueda de la presente invención pueden usarse como métodos de búsqueda para obtener moléculas de unión al antígeno con una capacidad incrementada (alta) de eliminar antígenos en plasma.

Adicionalmente, se espera que estas moléculas de unión al antígeno sean especialmente superiores como fármacos, debido a que permiten reducir la dosis y la frecuencia de administración en los pacientes, lo que permite reducir la dosis total. Por ende, los métodos de búsqueda de la presente pueden usarse como métodos para

buscar moléculas de unión al antígeno que han de usarse como composiciones farmacéuticas.

Además, en la presente invención se proveen bibliotecas cuyo contenido de histidina se halla incrementado, en comparación con las bibliotecas originales. Las bibliotecas que contienen moléculas de unión al antígeno con un contenido incrementado de histidina pueden usarse en el método de búsqueda descrito con anterioridad y los métodos de producción que se describirán más adelante.

Las bibliotecas con un contenido incrementado de histidina pueden prepararse con métodos conocidos por aquellos entrenados en la técnica, que incluyen el siguiente método. Para preparar una biblioteca de acuerdo con el método del trinucleótido, pueden incorporarse 20 tipos de codones triples (trinucleótidos), que codifican 20 tipos de aminoácidos, en una frecuencia igual, cuando se sintetizan los ácidos nucleicos (J Mol Biol. 29 de Febrero de 2008; 376(4): 1182-200). Como resultado, la posición mutada para la biblioteca puede prepararse de manera que contenga 20 tipos de aminoácidos con una probabilidad igual. La frecuencia de la histidina en la posición mutada para la biblioteca puede incrementarse aumentando la proporción de trinucleótidos que codifican histidina, en comparación con los 20 tipos de aminoácidos restantes en la síntesis.

<Métodos para producir moléculas de unión al antígeno>

La presente invención provee métodos para producir moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno al pH endosómico es menos que al pH del plasma. La presente invención también provee métodos para producir moléculas de unión al antígeno que son superiores en términos de la retención en plasma. La presente invención también provee métodos para producir moléculas de unión al antígeno que son de especial utilidad cuando se usan como composiciones farmacéuticas.

Específicamente, la presente invención provee métodos para producir moléculas de unión al antígeno, que comprenden los pasos de:

- (a) determinar la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a un valor de pH 6,7 a pH 10,0;
- (b) determinar la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a un valor de pH 4,0 a pH 6,5;

- (c) seleccionar una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a un valor de pH 6,7 a pH 10,0 es mayor que a un valor de pH 4,0 a pH 6,5;
- (d) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno seleccionado en (c); y
- (e) producir la molécula de unión al antígeno usando el gen obtenido en (d).

La presente invención también provee métodos para producir moléculas de unión al antígeno, que comprenden los pasos de:

- (a) unir una molécula de unión al antígeno a un antígeno a un valor de pH 6,7 a pH 10,0;
- (b) dejar asentar la molécula de unión al antígeno unida al antígeno de (a) bajo la condición de pH 4,0 a pH 6,5;
- (c) recolectar la molécula de unión al antígeno que se disocia bajo la condición de pH 4,0 a pH 6,5;
- (d) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno obtenida en (c); y
- (e) producir la molécula de unión al antígeno usando el gen obtenido en (d).

Aún más, la presente invención provee métodos para producir moléculas de unión al antígeno, que comprenden los pasos de:

- (a) seleccionar una molécula de unión al antígeno que no se une al antígeno bajo la condición de pH 4,0 a pH 6,5;
- (b) unir el antígeno bajo la condición de pH 6,7 a pH 10,0 a la molécula de unión al antígeno seleccionado en (a);
- (c) recolectar la molécula de unión al antígeno que se une al antígeno bajo la condición de pH 6,7 a pH 10,0;
- (d) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno recolectada en (c); y
- (e) producir la molécula de unión al antígeno usando el gen obtenido en (d).

Además, la presente invención provee métodos para producir moléculas de unión al antígeno, que comprenden los pasos de:

- (a) unir una molécula de unión al antígeno a un antígeno bajo la condición de pH 6,7 a 10,0;

- (b) dejar asentar la molécula de unión al antígeno que se unió al antígeno de (a) bajo la condición de pH 4,0 a pH 6,5;
- (c) recolectar la molécula de unión al antígeno que se disocia bajo la condición de pH 4,0 a pH 6,5;
- (d) amplificar el gen que codifica la molécula de unión al antígeno disociada;
- (e) recolectar la molécula de unión al antígeno eluida;
- (f) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno recolectada en (e); y
- (g) producir la molécula de unión al antígeno usando el gen obtenido en (f).

Los pasos (a) a (d) se pueden repetir dos o más veces. Por lo tanto, la presente invención provee los métodos descritos precedentemente, que además comprenden el paso de repetir los pasos (a) a (d) dos o más veces. En número de veces que se repite los pasos (a) a (d) no está particularmente limitado; sin embargo, en general es de diez veces o menos.

Aún más, la presente invención provee métodos para buscar y seleccionar moléculas de unión al antígeno, que comprenden los pasos de:

- (a) seleccionar una molécula de unión al antígeno que no se une al antígeno bajo la condición de pH 4,0 a pH 6,5;
- (b) unir el antígeno bajo la condición de pH 6,7 a pH 10,0 a la molécula de unión al antígeno seleccionado en (a);
- (c) recolectar la molécula de unión al antígeno que se une al antígeno bajo la condición de pH 6,7 a pH 10,0;
- (d) amplificar el gen que codifica la molécula de unión al antígeno disociada;
- (e) recolectar la molécula de unión al antígeno eluida;
- (f) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno recolectada en (e); y
- (g) producir la molécula de unión al antígeno usando el gen obtenido en (f).

Los pasos (a) a (d) se pueden repetir dos o más veces. Por lo tanto, la presente invención provee los métodos descritos precedentemente, que además comprenden el paso de repetir los pasos (a) a (d) dos o más veces. En número de veces que se repite los pasos (a) a (d) no está particularmente limitado; sin embargo, en general es de diez

veces o menos.

Aún más, la presente invención provee métodos para producir moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH es mayor que a un segundo pH, que comprenden los pasos de:

- (a) unir la molécula de unión al antígeno a una columna inmovilizada con antígeno bajo la primera condición de pH;
- (b) eluir la molécula de unión al antígeno, que está unida a la columna bajo la primera condición de pH de la columna bajo una segunda condición de pH;
- (c) recolectar la molécula de unión al antígeno eluida;
- (d) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno recolectada en (c); y
- (e) producir la molécula de unión al antígeno usando el gen obtenido en (d).

Aún más, la presente invención provee métodos para producir moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH es mayor que a un segundo pH, que comprenden los pasos de:

- (a) unir una biblioteca de moléculas de unión al antígeno a una columna inmovilizada con antígeno bajo la primera condición de pH;
- (b) eluir la molécula de unión al antígeno de la columna bajo una segunda condición de pH;
- (c) amplificar el gen que codifica la molécula de unión al antígeno eluida;
- (d) recolectar la molécula de unión al antígeno eluida;
- (e) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno recolectada en (d); y
- (f) producir la molécula de unión al antígeno usando el gen obtenido en (e).

Los pasos (a) a (c) se pueden repetir dos o más veces. Por lo tanto, la presente invención provee los métodos descritos precedentemente, que además comprenden el paso de repetir los pasos (a) a (c) dos o más veces. En número de veces que se repite los pasos (a) a (c) no está particularmente limitado; sin embargo, en general es de diez veces o menos.

Cuando se usa una biblioteca de fagos o semejante en los métodos de producción de la presente invención, el paso de amplificar el gen que codifica la

molécula de unión al antígeno puede ser el paso de amplificación de fagos.

Las sustancias que se unen al antígeno que se usan en los métodos de producción de la presente invención se pueden preparar mediante cualquier método. Por ejemplo, es posible usar anticuerpos preexistentes, bibliotecas preexistentes (bibliotecas de fagos y semejantes), anticuerpos y bibliotecas que se preparan a partir de hibridomas obtenidos por inmunización de animales o a partir de células B de animales inmunizados, anticuerpos y bibliotecas (bibliotecas con un alto contenido de histidina o aminoácidos no naturales, bibliotecas con introducción de histidina o aminoácidos no naturales en sitios específicos y semejantes) preparadas por introducción de mutaciones de histidina o mutaciones de aminoácidos no naturales en los anticuerpos y las bibliotecas que se describieron precedentemente y semejantes.

En los métodos de producción descritos anteriormente, la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a un valor de pH 6,7 a pH 10,0 no está particularmente limitada, en tanto la actividad de unión al antígeno sea la observada a un pH entre pH 6,7 y pH 10,0. Una actividad de unión al antígeno preferida es la observada a un pH de entre pH 7,0 y pH 8,0, y una actividad de unión al antígeno más preferida es la observada a un valor de pH de 7,4. Como alternativa, la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a un valor de pH 4,0 a pH 6,5 no está particularmente limitada, siempre y cuando la actividad de unión al antígeno es la observada a un pH entre pH 4,0 y pH 6,5. Una actividad de unión al antígeno preferida es la observada a un pH entre pH 5,5 a pH 6,5, y una actividad de unión al antígeno más preferida es la observada a un valor de pH de 5,8 o de pH de 5,5.

La actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno se puede determinar mediante métodos conocidos por los versados en la técnica. Las condiciones excepto por el pH pueden determinarse apropiadamente por los versados en la técnica.

El paso de seleccionar moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a un valor de pH 6,7 a pH 10,0 es mayor que a un valor de pH 4,0 a pH 6,5 es sinónimo del paso de seleccionar moléculas de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a un valor de pH 4,0 a pH 6,5 es menor que la observada a un valor de pH 6,7 a pH 10,0.

La diferencia en la actividad de unión al antígeno a un valor de pH 6,7 a pH 10,0 y

a un valor de pH 4,0 a pH 6,5 no está particularmente limitada siempre y cuando la actividad de unión al antígeno a un valor de pH 6,7 a pH 10,0 sea mayor que a un valor de pH 4,0 a pH 6,5. La actividad de unión al antígeno a un valor de pH 6,7 a pH 10,0 es preferentemente dos veces o mayor, más preferentemente diez veces o mayor, y aún más preferentemente 40 veces o mayor que a un valor de pH 4,0 a pH 6,5.

En los métodos de producción que se describieron precedentemente, la molécula de unión al antígeno puede unirse al antígeno bajo cualquier condición, y la condición no está particularmente limitada. Por ejemplo, la molécula de unión al antígeno se puede unir al antígeno por contacto del antígeno con la molécula de unión al antígeno inmovilizada o por contacto de la molécula de unión al antígeno con el antígeno inmovilizado. Como alternativa, la molécula de unión al antígeno se puede unir al antígeno por contacto del antígeno y molécula de unión al antígeno en una solución.

En los métodos de producción que se describieron precedentemente, cada uno del primer y el segundo valor de pH puede ser cualquier pH, siempre y cuando no sean idénticos. En una combinación preferida del primer y el segundo valor de pH, por ejemplo, el primer pH comprende entre pH 6,7 y pH 10,0 y el segundo pH comprende entre pH 4,0 y pH 6,5; en una combinación más preferida, el primer pH es de entre pH 7,0 y pH 8,0 y el segundo pH es de entre pH 5,5 y pH 6,5; y en una combinación aún más preferida, el primer pH es pH 7,4 y el segundo pH es pH 5,8 o pH 5,5.

En otra combinación preferida del primer y segundo valor de pH, por ejemplo, el primer pH comprende entre pH 4,0 y pH 6,5, y el segundo pH es de entre pH 6,7 y pH 10,0; en una combinación más preferida, el primer pH es de entre pH 5,5 y pH 6,5, y el segundo pH es de entre pH 7,0 y pH 8,0; y en una combinación aún más preferida, el primer pH es pH 5,8 o pH 5,5 y el segundo pH es pH 7,4.

Las moléculas de unión al antígeno que son producidas por los métodos de producción que se describieron precedentemente puede ser cualquier molécula de unión al antígeno. Las moléculas de unión al antígeno preferidas incluyen, por ejemplo, moléculas de unión al antígeno en donde al menos un aminoácido es sustituido por histidina o se insertado al menos una histidina. El sitio donde se introduce dicha mutación de histidina no está particularmente limitado y se puede introducir en cualquier sitio. Aún más, la mutación de histidina se puede introducir en un sitio o en dos o más

sitios.

Por lo tanto, los métodos de producción de la presente invención pueden comprender además el paso de sustituir al menos un aminoácido en una molécula de unión al antígeno por histidina o insertar al menos una histidina en moléculas de unión al antígeno.

En los métodos de producción de la presente invención, se pueden usar aminoácidos no naturales en lugar de histidina. Por ello, la presente invención también puede comprender reemplazar la histidina mencionada previamente por aminoácidos no naturales.

Aún más, en otra realización, las moléculas de unión al antígeno producidas mediante los métodos de producción que se describieron antes incluyen, por ejemplo, moléculas de unión al antígeno incluyendo regiones constantes de anticuerpos modificadas. Por lo tanto, los métodos de producción de la presente invención pueden comprender además el paso de modificar los aminoácidos de regiones constantes de anticuerpos.

Las moléculas de unión al antígeno que son producidas por los métodos de producción de la presente invención son superiores en términos de la retención en plasma. Por lo tanto, los métodos de producción de la presente invención se pueden usar como métodos para producir moléculas de unión al antígeno que son superiores en términos de la retención en plasma.

Aún más, se espera que las moléculas de unión al antígeno producidas mediante los métodos de producción puedan unirse al antígeno dos o más veces cuando son administradas a animales tales como seres humanos, ratones o monos. Por lo tanto, los métodos de producción de la presente invención se pueden usar como métodos para producir moléculas de unión al antígeno capaces de unirse al antígeno dos o más veces.

Aún más, se espera que las moléculas de unión al antígeno producidas mediante los métodos de producción de la presente invención puedan unirse a más antígenos en comparación con la cantidad de sus sitios de unión al antígeno cuando son administradas a animales tales como seres humanos, ratones o monos. Por lo tanto, los métodos de producción de la presente invención se pueden usar como métodos para producir moléculas de unión al antígeno capaces de unirse a más antígenos en

comparación con la cantidad de sus sitios de unión al antígeno.

Aún más, se espera que las moléculas de unión al antígeno producidas mediante los métodos de producción de la presente invención puedan disociarse dentro de una célula de un antígeno unido extracelularmente cuando sean administradas a animales tales como seres humanos, ratones o monos. Por lo tanto, los métodos de producción de la presente invención se pueden usar como métodos para producir moléculas de unión al antígeno capaces de disociarse dentro de una célula de un antígeno unido extracelularmente.

Aún más, se espera que las moléculas de unión al antígeno producidas mediante los métodos de producción de la presente invención se puedan unir a un antígeno e internalizar en una célula así como liberarse hacia el exterior de la célula en una forma libre de antígeno, cuando sean administradas a animales tales como seres humanos, ratones o monos. Por lo tanto, los métodos de producción de la presente invención se pueden usar como métodos para producir moléculas de unión al antígeno que puedan unirse a un antígeno e internalizar en una célula y liberarse hacia el exterior de la célula en una forma libre de antígeno.

Aún más, se espera que las moléculas de unión al antígeno producidas mediante los métodos de producción de la presente invención puedan eliminar rápidamente los antígenos del plasma cuando sean administradas a animales tales como seres humanos, ratones o monos. Por lo tanto, los métodos de producción de la presente invención se pueden usar como métodos para producir moléculas de unión al antígeno con una mayor capacidad (alta) para eliminar los antígenos en plasma.

Aún más, dichas moléculas de unión al antígeno pueden reducir el número de dosis en los pacientes y se espera que sean especialmente superiores como fármacos. Por lo tanto, los métodos de producción de la presente invención se pueden usar como métodos para producir moléculas de unión al antígeno para su uso como composiciones farmacéuticas.

Los genes obtenidos mediante los métodos de producción de la presente invención típicamente cuentan con soporte (están insertados) en vectores apropiados y luego son introducidos en células huésped. Los vectores no están particularmente limitados siempre y cuando puedan retener de manera estable los ácidos nucleicos

insertados. Por ejemplo, cuando se usa *Escherichia coli* (*E. coli*) como huésped, los vectores de clonación preferidos incluyen el vector pBluescript (Stratagene); sin embargo, se pueden usar distintos vectores disponibles comercialmente. Cuando se usan vectores para producir las moléculas de unión al antígeno de la presente invención, los vectores de expresión son de particular utilidad. Los vectores de expresión no están particularmente limitados siempre y cuando los vectores expresen las moléculas de unión al antígeno *in vitro*, en *E. coli*, en células de cultivo o en el cuerpo de un organismo. Por ejemplo, el vector pBEST (Promega) se prefiere para una expresión *in vitro*; el vector pET (Invitrogen) se prefiere para *E. coli*; el vector pME18S-FL3 (GenBank, N° Acceso AB009864) se prefiere para células de cultivo; y el vector pME18S (*Mol Cell Biol.* 8:466-472 (1988)) se prefiere para los cuerpos de organismos. Los ADN de la presente invención se pueden insertar en los vectores mediante métodos convencionales, por ejemplo, por ligación usando sitios de enzimas de restricción (*Current protocols in Molecular Biology*, edit. Ausubel *et al.*, (1987) Publish. John Wiley & Sons, Sección 11.4-11.11).

Las células huésped anteriores no están limitadas particularmente, y se pueden usar distintas células huésped dependiendo de la finalidad. Los ejemplos de células para expresar las moléculas de unión al antígeno incluyen células bacterianas (tales como células de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Streptomyces* y *Bacillus subtilis*), células eucariotas (tales como células de levadura y *Aspergillus*), células de insecto (tales como células S2 de *Drosophila* y SF9 de *Spodoptera*), células de animales (tal como células CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK293 y células de melanoma de Bowes) y células vegetales. Los vectores se pueden introducir en una célula huésped mediante métodos conocidos, por ejemplo, métodos de precipitación por fosfato de calcio, métodos de electroporación (*Current protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel *et al.* (1987) Publish. John Wiley & Sons, Sección 9.1-9.9), métodos de lipofección y métodos de microinyección.

Las células huésped se pueden cultivar mediante métodos conocidos. Por ejemplo, cuando se usan células de animales como un huésped, se puede usar DMEM, MEM, RPMI 1640 o IMDM como el medio de cultivo. Se pueden usar con suplementos de suero tales como FBS o suero fetal bovino (FCS). Las células se pueden cultivar en

cultivos sin suero. El pH preferido es de entre 6 y 8 aproximadamente durante el transcurso del cultivo. La incubación se conduce típicamente a una temperatura entre 30 y 40°C por aproximadamente 15 a 200 horas. El medio se cambia, airea o agita, según necesidad.

Se pueden incorporar señales de secreción apropiadas a los polipéptidos de interés de modo que las moléculas de unión al antígeno expresadas en la célula huésped serán secretadas hacia el lumen del retículo endoplasmático, hacia el espacio periplasmático o hacia el entorno extracelular. Estas señales pueden ser endógenas para las moléculas de unión al antígeno de interés o pueden ser señales heterólogas.

Por otro lado, por ejemplo, los sistemas de producción que emplean animales o plantas se pueden usar como sistemas para producir polipéptidos *in vivo*. El polinucleótido de interés se introduce en un animal o una planta y el polipéptido es producido en el cuerpo del animal o la planta, y luego se recolecta. Los “huéspedes” de la presente invención incluyen dichos animales y plantas.

El sistema de producción que emplea animales incluye a los que utilizan mamíferos o insectos. Se pueden usar mamíferos tales como cabras, cerdos, ovejas, ratones y bovinos (Vicki Glaser, *SPECTRUM BioTechnology Applications*, 1993). Los mamíferos pueden ser animales transgénicos.

Por ejemplo, se prepara un polinucleótido que codifica una molécula de unión al antígeno de la presente invención como un gen de fusión con un gen que codifica un polipéptido producido específicamente en leche, tal como la β -caseína de cabra. A continuación, los fragmentos de polinucleótidos que contienen al gen de fusión se inyectan en los embriones de cabra y luego se transplantan a cabras hembra. Las moléculas de unión al antígeno deseadas se pueden obtener de la leche producida por las cabras transgénicas, que nacieron de las cabras que recibieron a los embriones o de su descendencia. Se pueden administrar hormonas, según sea apropiado, para incrementar el volumen de leche que contiene a la molécula de unión al antígeno producida por las cabras transgénicas (Ebert *et al.*, *Bio/Technology* (1994) 12: 699-702).

Se pueden usar insectos tales como gusanos de seda para producir las moléculas de unión al antígeno de la presente invención. Cuando se usan gusanos de seda, se pueden emplear baculovirus que contienen un polinucleótido que codifica una molécula

de unión al antígeno de interés para infectar a los gusanos de seda y la molécula de unión al antígeno de interés se puede obtener de sus fluidos corporales.

Aún más, cuando se usan plantas para producir las moléculas de unión al antígeno de la presente invención se puede emplear, por ejemplo, tabaco. Cuando se usa tabaco, se inserta un polinucleótido que codifica una molécula de unión al antígeno de interés en un vector de expresión vegetal, por ejemplo, pMON 530, y luego dicho vector se introduce en bacterias, tales como *Agrobacterium tumefaciens*. Luego se deja que las bacterias infecten el tabaco, tal como *Nicotiana tabacum*, y las moléculas de unión al antígeno deseadas se pueden recolectar de sus hojas (Ma *et al.*, *Eur. J. Immunol.* (1994) 24: 131-138). Como alternativa, es posible infectar lentejas de agua (*Lemna minor*) con bacterias similares. Después de la clonación, se pueden obtener las moléculas de unión al antígeno deseadas de las células de lenteja de agua (Cox KM *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, diciembre de 2006; 24(12):1591-1597).

Las moléculas de unión al antígeno así obtenidas se pueden aislar del interior de las células huésped o fuera de ellas (tal como del medio y de la leche), y purificar como moléculas de unión al antígeno sustancialmente puras y homogéneas. Los métodos para aislar y purificar moléculas de unión al antígeno no están particularmente limitados, y habitualmente se emplean métodos de aislamiento y purificación para la purificación de los polipéptidos. Las moléculas de unión al antígeno se pueden aislar y purificar mediante una selección y combinación apropiadas, por ejemplo, columnas cromatográficas, filtración, ultrafiltración, desalado, precipitación por solvente, extracción con solvente, destilación, inmunoprecipitación, electroforesis sobre gel de SDS-poliacrilamida, enfoque isoelectrico y diálisis, recristalización.

Las cromatografías incluyen, por ejemplo, cromatografía por afinidad, cromatografía por intercambio iónico; cromatografía hidrofóbica, filtración sobre gel, cromatografía de fase reversa y cromatografía de adsorción (*Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*, Ed Daniel R. Marshak *et al.*, (1996) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Dichos métodos cromatográficos se pueden conducir usando cromatografía en fase líquida, tales como HPLC y FPLC. Las columnas usadas para una cromatografía por afinidad incluyen columnas de proteína A y columnas de proteína G. Las columnas que emplean proteína A incluyen, por ejemplo,

Hyper D, POROS y Sepharose F. F. (Pharmacia).

Si fuera necesario, es posible modificar una molécula de unión al antígeno arbitrariamente, y se pueden suprimir parcialmente péptidos para obtener una enzima con una modificación proteica apropiada que actúe antes o después de la purificación de la molécula de unión al antígeno. Dichas enzimas con modificaciones proteicas incluyen, por ejemplo, tripsina, quimiotripsina, lisil endopeptidasas, proteína quinasas y glucosidasas.

<Anticuerpos anti-receptor de IL-6>

Además, la presente invención provee los anticuerpos anti-receptor de IL-6 indicados a continuación de (a) a (m):

(a) un anticuerpo que incluye una región variable de la cadena pesada incluyendo una secuencia de aminoácidos, en donde al menos uno entre Tyr en la posición 27, Asp en la posición 31, Asp en la posición 32, Trp en la posición 35, Tyr en la posición 51, Asn en la posición 59, Ser en la posición 63, Met en la posición 106 y Tyr en la posición 108 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°1 (región variable H53) ha sido sustituido por His;

(b) un anticuerpo que incluye una región variable de la cadena pesada (H3pl) que tiene una secuencia de aminoácidos, en donde Tyr en la posición 27, Asp en la posición 31 y Trp en la posición 35 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°1 (región variable H53) ha sido sustituido por His;

(c) un anticuerpo que incluye una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos, en donde Tyr en la posición 27, Asp en la posición 31, Asp en la posición 32, Trp en la posición 35, Asn en la posición 59, Ser en la posición 63 y Tyr en la posición 108 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1 (región variable H53) ha sido sustituido por His;

(d) un anticuerpo que incluye una región variable de la cadena pesada (H170) que tiene una secuencia de aminoácidos, en donde Tyr en la posición 27, Asp en la posición 31, Asp en la posición 32, Trp en la posición 35, Asn en la posición 59, Ser en la posición 63 y Tyr en la posición 108 ha sido sustituido por His, y en donde Ser en la posición 99 ha sido sustituido por Val y Thr en la posición 103 ha sido sustituido por Ile en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1 (región variable H53);

- (e) un anticuerpo que incluye una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos, en donde Asp en la posición 31, Tyr en la posición 51, Ser en la posición 63, Met en la posición 106 y Tyr en la posición 108 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1 (región variable H53) ha sido sustituido por His;
- (f) un anticuerpo que incluye una región variable de la cadena pesada (CLH5) que tiene una secuencia de aminoácidos, en donde Asp en la posición 31, Tyr en la posición 51, Ser en la posición 63, Met en la posición 106 y Tyr en la posición 108 ha sido sustituido por His, y en donde Ser en la posición 99 ha sido sustituido por Phe y Thr en la posición 103 ha sido sustituido por Ile en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1 (región variable H53);
- (g) un anticuerpo que incluye una región variable de la cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos, en donde al menos uno entre Asp en la posición 28, Tyr en la posición 32, Glu en la posición 53, Ser en la posición 56 y Asn en la posición 92 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 2 (región variable PF1L) ha sido sustituido por His;
- (h) un anticuerpo que incluye una región variable de la cadena liviana (L73) que tiene una secuencia de aminoácidos, en donde Asp en la posición 28, Tyr en la posición 32 y Glu en la posición 53 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 2 (región variable PF1L) ha sido sustituido por His;
- (i) un anticuerpo que incluye una región variable de la cadena liviana (L82) que tiene una secuencia de aminoácidos, en donde Tyr en la posición 32 y Glu en la posición 53 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1 (región variable H53) ha sido sustituido por His;
- (j) un anticuerpo que incluye una región variable de la cadena liviana (CLL5) que tiene una secuencia de aminoácidos, en donde Tyr en la posición 32, Glu en la posición 53, Ser en la posición 56 y Asn en la posición 92 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 2 (región variable PF1L) ha sido sustituido por His;
- (k) un anticuerpo que incluye la región variable de la cadena pesada de (b) y la región variable de la cadena liviana de (h);
- (l) un anticuerpo que incluye la región variable de la cadena pesada de (d) y la región variable de la cadena liviana de (i); y

(m) un anticuerpo que incluye la región variable de la cadena pesada de (f) y la región variable de la cadena liviana de (h).

La región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos en donde al menos uno entre Tyr en la posición 27, Asp en la posición 31, Asp en la posición 32, Trp en la posición 35, Tyr en la posición 51, Asn en la posición 59, Ser en la posición 63, Met en la posición 106 y Tyr en la posición 108 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 1 (región variable H53) ha sido sustituido por His incluye, por ejemplo, las siguientes regiones variables de la cadena pesada.

la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 3 (H3pl)

la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 4 (H170)

la región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 5 (CLH5)

La región variable de la cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos, en donde al menos uno entre Asp en la posición 28, Tyr en la posición 32, Glu en la posición 53, Ser en la posición 56 y Asn en la posición 92 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 2 (región variable PF1L) ha sido sustituido por His incluye, por ejemplo, las siguientes regiones variables de la cadena pesada.

la región variable de la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 6 (L73)

la región variable de la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 7 (L82)

la región variable de la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 8 (CLL5)

Las posiciones y sustituciones de aminoácidos en cada uno de los anticuerpos H3pl, H170, CLH5, L73, L82 y CLL5 descritos precedentemente se muestran a continuación en la Tabla 1. Las posiciones de aminoácidos se muestran sobre la base de la numeración de Kabat.

[Tabla 1]

posición	27	31	32	33	35	50	58	61	62	63	64	65	95	99	100B	102
----------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	------	-----

H3Pi	H	H		H	H					
H170	H	H	H	H	H		H		H	V I H
CLH5		H		H		H		H		F I H H
posición	24	27	28	32	53	55	56	90	92	94
L73			H	H	H	H				
L82				H	H	H				
CLL5				H	H	H	H		H	

* En WT, la cadena H tiene histidina en la posición 33, en tanto la cadena L tiene histidina en la posición 55.

La presente invención provee anticuerpos que contienen al menos cualquiera de las sustituciones de aminoácidos que se describieron precedentemente en (a) a (j), y los métodos para producir los anticuerpos. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención también incluyen anticuerpos que no solo contienen cualquiera de las sustituciones de aminoácidos descritas previamente en (a) a (j) sino también anticuerpos que contienen una o más sustituciones de aminoácidos distintas de las descritas previamente en (a) a (j). Las sustituciones de aminoácidos distintas de las descritas precedentemente en (a) a (j) incluyen, por ejemplo, una sustitución, supresión, adición y/o inserción en la secuencia de aminoácidos de las CDR y las FR.

Además, la presente invención provee los anticuerpos anti-receptor de IL-6 indicados a continuación de (1) a (28):

- (1) un anticuerpo que incluye la región variable de la cadena pesada (región variable VH1-IgG1) que tiene la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a 119 en la SEQ ID N° 21 (VH1-IgG1);
- (2) un anticuerpo que incluye la región variable de la cadena pesada (región variable VH2-IgG1) que tiene la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a 119 en la SEQ ID N° 22 (VH2-IgG1);
- (3) un anticuerpo que incluye la región variable de la cadena pesada (región variable VH3-IgG1) que tiene la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a 119 en la SEQ ID N° 23 (VH3-IgG1);
- (4) un anticuerpo que incluye la región variable de la cadena pesada (región variable VH4-IgG1) que tiene la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a 119 en la SEQ ID

Nº 24 (VH4-IgG1);

(5) un anticuerpo que incluye la región variable de la cadena liviana (región variable VL1-CK) que tiene la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a 107 en la SEQ ID Nº 25 (VL1-CK);

(6) un anticuerpo que incluye la región variable de la cadena liviana (región variable VL2-CK) que tiene la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a 107 en la SEQ ID Nº 26 (VL2-CK);

(7) un anticuerpo que incluye la región variable de la cadena liviana (región variable VL3-CK) que tiene la secuencia de aminoácidos de la posición 1 a 107 en la SEQ ID Nº 27 (VL3-CK);

(8) un anticuerpo (Fv1-IgG1) que incluye la región variable de la cadena pesada de (2) y la región variable de la cadena liviana de (6);

(9) un anticuerpo (Fv2-IgG1) que incluye la región variable de la cadena pesada de (1) y una región variable de la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID Nº 7 (L82);

(10) un anticuerpo (Fv3-IgG1) que incluye la región variable de la cadena pesada de (4) y la región variable de la cadena liviana de (5);

(11) un anticuerpo (Fv4-IgG1) que incluye la región variable de la cadena pesada de (3) y la región variable de la cadena liviana de (7);

(12) un anticuerpo (VH3-IgG2ΔGK) que incluye a cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID Nº 33;

(13) un anticuerpo (VH3-M58) que incluye una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID Nº 34;

(14) un anticuerpo (VH3-M73) que incluye una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID Nº 35;

(15) un anticuerpo (Fv4-IgG2ΔGK) que incluye la cadena pesada de (12) y una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID Nº 27 (VL3-CK);

(16) un anticuerpo (Fv4-M58) que incluye la cadena pesada de (13) y una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID Nº 27 (VL3-CK);

(17) un anticuerpo (Fv4-M73) que incluye la cadena pesada de (14) y una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID Nº 27 (VL3-CK);

- (18) un anticuerpo (VH2-M71) que incluye una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 36 (VH2-M71);
- (19) un anticuerpo (VH2-M73) que incluye una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 37 (VH2-M73);
- (20) un anticuerpo (VH4-M71) que incluye una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 38 (VH4-M71);
- (21) un anticuerpo (VH4-M73) que incluye una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 39 (VH4-M73);
- (22) un anticuerpo (Fv1-M71) que incluye la cadena pesada de (18) y una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 26 (VL2-CK);
- (23) un anticuerpo (Fv1-M73) que incluye la cadena pesada de (19) y una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 26 (VL2-CK);
- (24) un anticuerpo (Fv3-M71) que incluye la cadena pesada de (20) y una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 25 (VL1-CK);
- (25) un anticuerpo (Fv3-M73) que incluye la cadena pesada de (21) y una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 25 (VL1-CK);
- (26) un anticuerpo que incluye una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 25 (VL1-CK);
- (27) un anticuerpo que incluye una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 26 (VL2-CK); y
- (28) un anticuerpo que incluye una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 27 (VL3-CK).

Aún más, la presente invención provee las FR y las CDR de (a) a (v) que se indican a continuación:

- (a) la cadena pesada CDR1 de SEQ ID N° 40 (VH1, 2, 3, 4);
- (b) la cadena pesada CDR2 de SEQ ID N° 41 (VH1, 2);
- (c) la cadena pesada CDR2 de SEQ ID N° 42 (VH3);
- (d) la cadena pesada CDR2 de SEQ ID N° 43 (VH4);
- (e) la cadena pesada CDR3 de SEQ ID N° 44 (VH1, 2);
- (f) la cadena pesada CDR3 de SEQ ID N° 45 (VH3, 4);
- (g) la cadena pesada FR1 de SEQ ID N° 46 (VH1, 2);

- (h) la cadena pesada FR1 de SEQ ID N° 47 (VH3, 4);
- (i) la cadena pesada FR2 de SEQ ID N° 48 (VH1, 2, 3, 4);
- (j) la cadena pesada FR3 de SEQ ID N° 49 (VH1);
- (k) la cadena pesada FR3 de SEQ ID N° 50 (VH2);
- (l) la cadena pesada FR3 de SEQ ID N° 51 (VH3, 4);
- (m) la cadena pesada FR4 de SEQ ID N° 52 (VH1, 2, 3, 4);
- (n) la cadena liviana CDR1 de SEQ ID N° 53 (VL1, 2);
- (o) la cadena liviana CDR1 de SEQ ID N° 54 (VL3);
- (p) la cadena liviana CDR2 de SEQ ID N° 55 (VL1, VL3);
- (q) la cadena liviana CDR2 de SEQ ID N° 56 (VL2);
- (r) la cadena liviana CDR3 de SEQ ID N° 57 (VL1, 2, 3);
- (s) la cadena liviana FR1 de SEQ ID N° 58 (VL1, 2, 3);
- (t) la cadena liviana FR2 de SEQ ID N° 59 (VL1, 2, 3);
- (u) la cadena liviana FR3 de SEQ ID N° 60 (VL1, 2, 3); y
- (v) la cadena liviana FR4 de SEQ ID N° 61 (VL1, 2, 3).

Las respectivas secuencias de los ítems (a) a (v) anteriores se muestran en la Fig. 25. Aún más, la presente invención provee polipéptidos que incluyen cualquiera de las FR y CDR de los ítems (a) a (v) anteriores.

Los anticuerpos anti-receptor de IL-6 de la presente invención también incluyen fragmentos y productos de anticuerpos modificados incluyendo cualquiera de las sustituciones de aminoácidos que se describieron precedentemente. Dichos fragmentos de anticuerpo incluyen, por ejemplo, Fab, F(ab')₂, Fv, Fv de cadena simple (scFv) en donde el Fv de las cadenas H y L están ligadas entre sí por medio de un ligador apropiado, dominio único de la cadena H y dominio único de la cadena L (por ejemplo, *Nat. Biotechnol.*, septiembre de 2005; 23(9):1126-36), Unibody (WO 2007059782 A1) y SMIP (WO 2007014278 A2). El origen de los anticuerpos no está particularmente limitado. Los anticuerpos incluyen anticuerpos humanos, de ratón, rata y de conejo. Los anticuerpos de la presente invención también pueden ser anticuerpos quiméricos, humanizados, completamente humanizados o semejantes.

Específicamente, dichos fragmentos de anticuerpo se obtienen mediante tratamiento de los anticuerpos con enzimas, por ejemplo, papaína o pepsina, o por

construcción de genes que codifican dichos fragmentos de anticuerpo, inserción de los mismos en vectores de expresión y expresión de ellos en células huésped apropiadas (véase, por ejemplo, Co, M. S. et al., *J. Immunol.* (1994) 152, 2968-2976; Better, M. & Horwitz, A. H., *Methods in Enzymology* (1999) 178, 476-496; Plueckthun, A. & Skerra, A., *Methods in Enzymology* (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., *Methods in Enzymology* (1999) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 663-66; Bird, R. E. et al., *TIBTECH* (1991) 9, 132-137).

La presente invención provee métodos para producir (i) un polipéptido de la presente invención, o (ii) un polipéptido codificado por un gen que codifica al polipéptido de la presente invención, en donde los métodos comprenden el paso de cultivar una célula huésped que alberga un vector en el cual se introduce un polinucleótido que codifica al polipéptido de la presente invención.

Más específicamente, la presente invención provee métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprenden los pasos de

- (a) cultivar una célula huésped que comprende un vector en el cual se introduce un gen que codifica al polipéptido de la presente invención; y
- (b) obtener el polipéptido codificado por el gen.

El scFv se obtiene ligando las regiones V de las cadenas de anticuerpo H y L. En dicho scFv, la región V de la cadena H está ligada a la región V de la cadena L por medio de un ligador, preferentemente un ligador peptídico (Huston, J. S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* (1988) 10.0, 5879-5883). Las regiones V de la cadena H y de la cadena L en un scFv pueden derivar de cualquiera de los anticuerpos que se describieron antes. El ligador peptídico para ligar las regiones V incluye, por ejemplo, péptidos arbitrarios de cadena simple de 12 a 19 residuos de aminoácidos.

Cuando un anticuerpo anti-receptor de IL-6 de la presente invención incluye una región constante, la región constante puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, se puede usar IgG1, IgG2 o IgG4. La región constante es preferentemente una región constante de un anticuerpo humano. Como alternativa, la región constante puede ser una forma modificada incluyendo una sustitución, supresión, adición y/o inserción en la secuencia de aminoácidos de las regiones constantes de la IgG1 humana, la IgG2 humana o la IgG4 humana.

El receptor de IL-6 preferido al cual se une un anticuerpo anti-receptor de IL-6 de la presente invención es el receptor de IL-6 humano.

Los anticuerpos anti-receptor de IL-6 de la presente invención son superiores en términos de la retención en plasma, y existen por un período prolongado en el plasma en una forma capaz de unirse al antígeno, receptores de IL-6 solubles o asociados a membrana. Por lo tanto, los anticuerpos anti-receptor de IL-6 se unen *in vivo* a receptores de IL-6 solubles o asociados membrana por un período prolongado. Aún más, los anticuerpos anti-receptor de IL-6 tienen la capacidad de unirse a los receptores de IL-6 dos o más veces, y por lo tanto se supone que pueden neutralizar tres o más receptores de IL-6.

<Composiciones farmacéuticas>

La presente invención también se relaciona con composiciones farmacéuticas que incluyen las moléculas de unión al antígeno de la presente invención, moléculas de unión al antígeno aisladas mediante los métodos de búsqueda y selección de la presente invención o moléculas de unión al antígeno producidas mediante los métodos de producción de la presente invención. Las moléculas de unión al antígeno de la presente invención y las moléculas de unión al antígeno producidas mediante los métodos de producción de la presente invención son superiores en términos de la retención en plasma, y por lo tanto, se espera que reduzcan la frecuencia de administración de las moléculas de unión al antígeno y por ende son de utilidad como composiciones farmacéuticas. La composición farmacéutica de la presente invención puede incluir vehículos farmacéuticamente aceptables.

En la presente invención, las composiciones farmacéuticas se refieren comúnmente a agentes para tratar o prevenir o evaluar y diagnosticar enfermedades.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular mediante métodos conocidos por los versados en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar por vía parenteral, en la forma de inyecciones de soluciones o suspensiones estériles incluyendo agua u otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, dichas composiciones se pueden formular por mezclado en la forma de las dosis unitarias requeridas en la práctica de elaboración de medicamentos aprobada en general por combinación apropiada con vehículos o medios farmacéuticamente

aceptable, específicamente con agua estéril, salina fisiológica, aceite vegetal, emulsionantes, suspensiones, agentes tensioactivos, estabilizadores, agentes saborizantes, excipientes, vehículos, conservantes, aglutinantes o semejantes. En dichas formulaciones, se ajusta la cantidad de ingrediente activo para obtener una cantidad apropiada en un rango predeterminado.

Las composiciones estériles para inyectables se pueden formular usando vehículos tales como agua destilada para inyecciones, de acuerdo con la práctica de formulación estándar.

Las soluciones acuosas para inyectables incluyen, por ejemplo, salina fisiológica y soluciones isotónicas que contienen dextrosa u otros adyuvantes (por ejemplo, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro de sodio). También es posible usar en una combinación solubilizadores apropiados, por ejemplo, alcoholes (etanol y semejantes), polialcoholes (propilenglicol, polietilenglicol y semejantes), agentes tensioactivos no iónicos (polisorbato 80(TM), HCO-50 y semejantes).

Los aceites incluyen aceite de sésamo y aceites de soja. Se puede usar benzoato de bencilo y/o alcohol bencílico en la combinación como solubilizadores. También es posible combinar soluciones amortiguadoras (por ejemplo, solución amortiguadora de fosfato y solución amortiguadora de acetato de sodio), agentes sedantes (por ejemplo, clorhidrato de procaína), estabilizantes (por ejemplo, alcohol bencílico y fenol) y/o antioxidantes. Se rellenan ampollas apropiadas con las inyecciones preparadas.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran preferentemente por vía parenteral. Por ejemplo, las composiciones se pueden encontrar en una forma de dosificación para inyecciones, para una administración transnasal, administración transpulmonar o una administración transdérmica. Por ejemplo, se pueden administrar por vía sistémica o local mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, o semejantes.

Los métodos de administración se pueden seleccionar apropiadamente teniendo en consideración la edad y los síntomas del paciente. La dosis de una composición farmacéutica que contiene una molécula de unión al antígeno puede comprender, por ejemplo, entre 0,0001 y 1000 mg/kg para cada administración. Como alternativa, la dosis puede comprender, por ejemplo, de 0,001 a 100,000 mg por paciente. Sin embargo, la

presente invención no está limitada por los valores numéricos que se describieron precedentemente. Las dosis y los métodos de administración varían dependiendo del peso, la edad, los síntomas del paciente y semejantes. Los versados en la técnica pueden definir las dosis y los métodos de administración apropiados teniendo en consideración los factores descritos previamente.

Los aminoácidos contenidos en las secuencias de aminoácidos de la presente invención pueden modificarse después de la traducción. Por ejemplo, la modificación de un residuo de glutamina N-terminal (Gln) en un residuo de ácido piroglutámico (pGlu) por piroglutamilación es bien conocida por los versados en la técnica. Naturalmente, dichos aminoácidos modificados después de la traducción están incluidos en las secuencias de aminoácidos en la presente invención.

Todos los documentos de la técnica anterior citados en la memoria descriptiva se incorporan en la presente a modo de referencia.

EJEMPLOS

Más adelante en la presente documentación, la presente invención se describirá específicamente con referencia a los ejemplos, pero no se debe interpretar como limitada a los mismos.

EJEMPLO 1: Producción de anticuerpo PM1 humanizado modificado

Preparación de receptor de IL-6 humano soluble recombinante (SR344)

Se preparó un receptor de IL-6 humano recombinante, que sirvió como antígeno, tal como se describe más adelante. Se produjo una línea celular CHO que expresa constantemente un receptor de IL-6 humano soluble (a partir de aquí denominado como SR344) (Yamasaki, et al., Science 1988; 241: 825-828 (GenBank #X12830)) que consiste en la secuencia de aminoácidos desde el 1^{er} aminoácido hasta el 344^{to} aminoácido en el extremo N terminal tal como se informó en J. Biochem., 108, 673-676 (1990).

Se purificó SR344 del sobrenadante de cultivo obtenido de las células CHO que expresan SR344 usando tres columnas cromatográficas: cromatografía en columna cromatográfica Blue Sepharose 6 FF, cromatografía de afinidad usando una columna en la cual se encuentra inmovilizado un anticuerpo específico contra SR344, y

cromatografía en columna de filtración en gel. La fracción que eluyó como el pico principal se usó como el producto purificado final.

Preparación de receptor de IL-6 soluble recombinante de mono macaco (cIL-6R)

Se produjeron cebadores de oligo ADN Rhe6Rf1 (SEQ ID N° 16) y Rhe6Rr2 (SEQ ID N° 17) en base a la secuencia públicamente disponible del gen del receptor de IL-6 de mono Rhesus (Birney et al., Ensemble 2006, Nucleic Acids Res., 2006, Jan. 1; 34 (publicación de base de datos): D556-61). Usando ADNc preparado de páncreas de *cynomolgus* como molde, se preparó por PCR un fragmento de ADN que codifica para la longitud total del gen del receptor de IL-6 de mono macaco usando cebadores Rhe6Rf1 y Rhe6Rr2. Usando el fragmento de ADN resultante como molde, se amplificó por PCR un fragmento de ADN de 1131 pb (SEQ ID N° 20) que codifica para una proteína en la cual se agrega 6xHis al extremo C terminal de una región soluble (Met1-Pro363) que contiene una región señal del gen del receptor de IL-6 de mono macaco, usando los cebadores de oligo ADN CynoIL6R N-EcoRI (SEQ ID N° 18) y CynoIL6R C-NotI-His (SEQ ID N° 19). El fragmento resultante de ADN se digirió con EcoRI-NotI y se insertó en un vector de expresión en células mamíferas, y esto luego se usó para producir una línea CHO de expresión estable (células CHO productoras de cyno.sIL-6R).

Se purificó un medio de cultivo de células CHO productoras de cyno.sIL-6R con una columna HisTrap (GE Healthcare Biosciences), se concentró usando Amicon Ultra-15 Ultracel-10k (Millipore), y además se purificó con una columna de filtración en gel Superdex 200 pg 16/60 (GE Healthcare Biosciences) para obtener el producto purificado final de receptor de IL-6 de mono macaco soluble (a partir de aquí denominado como cIL-6R).

Preparación de IL-6 de mono macaco recombinante (cIL-6)

Se preparó IL-6 de mono macaco tal como sigue. Se produjo una secuencia de nucleótidos que codifican para los 212 aminoácidos registrada bajo el número de acceso a SWISSPROT P79341, se clonó en un vector de expresión en células mamíferas, y se introdujo en células CHO para producir una línea celular de expresión estable (células CHO productoras de cyno.IL-6). Se purificó un medio de cultivo de células CHO productoras de cyno.IL-6 con una columna SP-Sepharose/FF (GE Healthcare Biosciences), se concentró usando Amicon Ultra-15 Ultracel-5k (Millipore), y luego se

purificó adicionalmente con una columna de filtración en gel Superdex 75 pg 26/60 (GE Healthcare Biosciences). Esto se concentró usando Amicon Ultra-15 Ultracel-5k (Millipore) para obtener un producto purificado final de IL-6 de mono macaco (a partir de aquí denominado como cIL-6).

Establecimiento de línea celular BaF3 que expresa gp130 humano

Se estableció una línea celular BaF3 que expresa gp130 humano tal como se indica más adelante con el objetivo de obtener una línea celular que muestre un crecimiento dependiente de IL-6.

Se amplificó por PCR el ADNc de gp130 humano de longitud completa (Hibi et al., Cell 1990; 63: 1149-1157 (GenBank #NM_002184)) y se clonó en el vector de expresión pCOS2Zeo, el cual se preparó por eliminación del sitio de expresión del gen DHFR de pCHO1 (Hirata, et al., FEBS Letter 1994; 356: 244-248) e inserción del sitio de expresión del gen de resistencia a Zeocina, para construir pCOS2Zeo/gp130. Se amplificó por PCR el IL-6R humano de longitud completa y se clonó en pcDNA3.1(+) (Invitrogen) para construir hIL-6R/pcDNA3.1(+). Se mezclaron 10 µg de pCOS2Zeo/gp130 en células BaF3 ($0,8 \times 10^7$ células) suspendidas en PBS, y se pulsaron usando un Gene Pulser (Bio-Rad) con un voltaje de 0,33 kV y una capacitancia de 950 µFD. Se cultivaron células BaF3 después de someterse a introducción de genes por tratamiento por electroporación durante todo un día y noche en medio RPMI1640 (Invitrogen) conteniendo 0,2 ng/ml de interleuquina-3 de ratón (Peprotech) y 10% de suero fetal bovino (a partir de aquí denominado como FBS, HyClone), y luego se hizo una búsqueda por agregado de medio RPMI1640 conteniendo 100 ng/ml de interleuquina-6 humana (R&D Systems), 100 ng/ml de receptor soluble de interleuquina-6 humana (R&D Systems) y 10% de FBS para establecer una línea celular BaF3 que expresa gp130 humano (a partir de aquí denominada como BaF3/gp130). Dado que este BaF3/gp130 prolifera en presencia de interleuquina-6 humana (R&D Systems) y SR344, se puede usar para evaluar la actividad inhibitoria del crecimiento (es decir, actividad neutralizante del receptor de IL-6) del anticuerpo contra el receptor de IL-6.

Producción del anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado

En el contexto del ejemplo inmediato y en cualquier otro lado en la presente documentación, el término "tipo salvaje" está abreviado como WT, el término "cadena H

de tipo salvaje” está abreviado como H(WT) (secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 9), y el término “cadena L de tipo salvaje está abreviado como L(WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO. 10). En este contexto, se introdujeron mutaciones en la secuencia de la estructura y secuencia CDR del anticuerpo PM1 de ratón humanizado tal como se describe en Cancer Res. 1993, Feb. 15; 53(4): 851-6, para producir cadenas H modificadas H53 (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 1) y PF1H (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 11), y L28 cadenas L modificadas (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 12) y PF1L (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 2). Más específicamente, los mutantes se produjeron usando el conjunto de elementos QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) de acuerdo al método descrito en las instrucciones provistas, y los fragmentos de plásmido resultantes se insertaron en un vector de expresión en células mamíferas para producir los vectores de expresión de cadena H y los vectores de expresión de cadena L deseados. Las secuencias de nucleótidos de los vectores de expresión obtenidos se determinaron usando metodologías convencionales conocidas por personas con experiencia en el arte.

Expresión y purificación de anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado

Los anticuerpos se expresaron por el método descrito más adelante. Se suspendió la línea celular HEK293H derivadas de cáncer de riñón embrionario humano (Invitrogen) en DMEM (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Invitrogen). Se plaquearon 10 ml de células por disco en discos para células adherentes (10 cm de diámetro; CORNING) a una densidad celular de entre $5 \text{ y } 6 \times 10^5$ células/ml y se cultivaron en un incubador de CO₂ (37°C, 5% de CO₂) durante todo un día y noche. Luego, el medio se quitó por aspiración, y se agregaron 6,9 ml de medio CHO-S-SFM-II (Invitrogen). El plásmido preparado se introdujo en las células por el método de lipofección. Los sobrenadantes de cultivo resultantes se recolectaron, se centrifugaron (aproximadamente 2000 g, 5 min, temperatura ambiente) para eliminar células, y se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,22-µm MILLEX®-GV (Millipore) para obtener los sobrenadantes. Los anticuerpos se purificaron de los sobrenadantes de cultivo obtenidos por un método conocido por aquellos con experiencia en el arte usando rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Amersham Biosciences). Para determinar la concentración del anticuerpo purificado, se midió la absorbancia a 280 nm usando un

espectrofotómetro. Las concentraciones de anticuerpo se calcularon a partir de los valores determinados usando un coeficiente de absorbancia calculado por el método de PACE (Protein Science 1995; 4:2411-2423).

EJEMPLO 2: Producción de anticuerpo H3pI/L73 de unión dependiente de pH

Método para la creación de anticuerpo con capacidad de neutralizar antígenos múltiples veces

Dado que las moléculas de IgG son divalentes, una única molécula de IgG puede neutralizar hasta dos moléculas de antígeno cuando los dos sitios se unen a los antígenos; sin embargo, no puede neutralizar tres o más moléculas de antígeno. Por lo tanto, para mantener el efecto neutralizante de un anticuerpo neutralizador durante cierto período de tiempo, es necesario administrar una cantidad igual de anticuerpo o mayor que la cantidad de antígeno producido durante el período. Por lo tanto, hay una limitación en la cantidad a la cual la dosis requerida de anticuerpo se puede reducir mejorando la farmacocinética o afinidad del anticuerpo. Por lo tanto, si fuera posible neutralizar dos o más moléculas de antígeno con una única molécula de IgG, la misma dosis puede mejorar la duración del efecto neutralizante, o alternatively se puede reducir la dosis de anticuerpo requerida para alcanzar la misma duración.

Para anticuerpos neutralizadores, hay dos tipos de antígenos blanco: antígenos del tipo solubles, que están presentes en plasma, y antígenos unidos a membrana, que se expresan en la superficie de las células.

Cuando el antígeno es un antígeno unido a membrana, un anticuerpo administrado se une al antígeno de membrana en la superficie celular, y el anticuerpo posteriormente es incorporado a endosomas en la célula por internalización junto con el antígeno de membrana unido al anticuerpo. Luego, el anticuerpo que se mantiene unido al antígeno se mueve a un lisosoma cuando es degradado por el lisosoma junto con el antígeno. La eliminación del anticuerpo del plasma mediado por internalización por antígenos de membrana se refiere como eliminación dependiente de antígeno, y esto ha sido informado para numerosas moléculas de anticuerpo (Drug Discov. Today, 2006 Jan; 11(1-2): 81-8). Debido a que una única molécula de anticuerpo IgG se une a dos moléculas de antígeno cuando se une en forma divalente a antígenos, y luego es

internalizado y degradado directamente por el lisosoma, una única molécula de anticuerpo IgG ordinaria no puede neutralizar dos o más moléculas de antígeno (Fig. 1).

La razón de la larga retención (baja eliminación) de moléculas de IgG en plasma es por la función de FcRn, conocido como un receptor salvaje de moléculas de IgG (Nat. Rev. Immunol. 2007 Sep; 7(9): 715-25). Las moléculas de IgG que han sido internalizadas dentro de endosomas por pinocitosis se unen al FcRn expresado en endosomas bajo condiciones ácidas endosomales. Las moléculas de IgG unidas a FcRn se mueven hacia la superficie celular donde se disocian de FcRn bajo las condiciones neutras del plasma y regresan al plasma, mientras que las moléculas de IgG sin capacidad de unirse a FcRn continúan hacia los lisosomas donde son degradadas (Fig. 2).

Las moléculas de IgG unidas al antígeno de membrana son incorporadas dentro de endosomas intracelulares por internalización, se mueven a lisosomas mientras están unidas al antígeno, y sufren la degradación. Cuando un anticuerpo IgG se une en forma divalente a antígenos, éste neutraliza dos moléculas de antígeno y sufre degradación junto con los antígenos. Si el anticuerpo IgG, cuando es incorporado dentro de los endosomas intracelulares por internalización, se puede disociar del antígeno bajo las condiciones ácidas intraendosomales, el anticuerpo disociado puede tener la capacidad de unirse a FcRn expresado en los endosomas. La molécula de IgG disociada del antígeno y unida a FcRn se transfiere a la superficie celular y luego se disocia de FcRn bajo las condiciones neutras del plasma, regresando así nuevamente al plasma. La molécula de IgG que ha regresado al plasma tiene la capacidad de unirse nuevamente a una nueva molécula de antígeno. La repetición de este proceso le permite a una única molécula de IgG unirse en forma repetida a antígenos de membrana, permitiendo de este modo la neutralización de múltiples antígenos con una única molécula de IgG (Fig. 3).

En el caso de un antígeno soluble, un anticuerpo administrado se une al antígeno en el plasma, y permanece en el plasma en la forma de un complejo antígeno-anticuerpo. Normalmente, mientras la retención del anticuerpo en plasma es muy larga (la tasa de eliminación es muy lenta) debido a la función de FcRn tal como se describió anteriormente, la retención de antígeno en plasma es corta (la tasa de eliminación es

rápida). Por lo tanto, los antígenos unidos a anticuerpo muestran una retención en plasma comparable a la del anticuerpo (la tasa de eliminación es muy lenta). Los antígenos se producen en el cuerpo a una velocidad constante y, en la ausencia de anticuerpo, están presentes en plasma en una concentración a la cual la tasa de producción de antígeno y la tasa de eliminación de antígeno están en equilibrio. En presencia de un anticuerpo, la mayoría de los antígenos están unidos a los anticuerpos, resultando en una eliminación de antígenos muy lenta. Por lo tanto, la concentración de antígeno en plasma aumenta en comparación con aquella en ausencia de anticuerpo (Kidney Int. 2003, 64, 697-703; J. National Cancer Institute 2002, 94(19), 1484-1493; J. Allergy and Clinical Immunology 1997, 100(1), 110-121; Eur. J. Immunol. 1993, 23; 2026-2029). Aun si la afinidad del anticuerpo por el antígeno es infinita, la concentración de antígeno aumenta cuando el anticuerpo se elimina lentamente del plasma, y el efecto neutralizante del anticuerpo termina luego de que se igualan las concentraciones de anticuerpo y antígeno. A pesar que los anticuerpos con una constante de disociación fuerte (KD) pueden neutralizar antígenos solubles con una concentración de anticuerpo baja, los anticuerpos a una concentración de la mitad o menos que la concentración de antígeno presente son capaces de neutralizar antígenos sin importar cuán fuerte es la afinidad del anticuerpo (Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005 Sep 9; 334(4): 1004-13). Como en el caso de las moléculas de IgG no unidas a antígenos, las moléculas de IgG unidas a antígenos en el plasma también son incorporadas a endosomas por pinocitosis, y se unen al FcRn expresado en endosomas bajo las condiciones ácidas intraendosomales. Las moléculas de IgG unidas a FcRn se mueven hacia la superficie celular mientras que el anticuerpo se mantiene unido al antígeno y luego se disocia del FcRn bajo las condiciones neutras del plasma. Dado que las moléculas de IgG regresan al plasma mientras están unidas al antígeno, no pueden unirse a nuevos antígenos en el plasma. En este caso, si las moléculas de IgG se pueden disociar del antígeno bajo las condiciones ácidas intraendosomales, el antígeno disociado no tendrá la capacidad de unirse a FcRn y de este modo podrá ser degradado por lisosomas. Por otro lado, las moléculas de IgG pueden regresar al plasma nuevamente por unión a FcRn. Dado que las moléculas de IgG que han regresado al plasma ya se han disociado del antígeno en los endosomas, tienen la capacidad de unirse a un nuevo antígeno nuevamente en el

plasma. La repetición de este proceso permite que una única molécula de IgG se una a antígenos solubles en forma repetida. Esto permite que una única molécula de IgG neutralice múltiples antígenos (Fig. 4).

De este modo, sin importar si el antígeno es un antígeno de membrana o un antígeno soluble, si la disociación del anticuerpo IgG del antígeno es posible bajo condiciones ácidas intraendosomales, una única molécula de IgG podría tener la capacidad de neutralizar antígenos repetidamente. Para que los anticuerpos IgG se disocien de los antígenos bajo condiciones ácidas intraendosomales, es necesario que la unión antígeno-anticuerpo sea considerablemente más débil en condiciones ácidas que en condiciones neutras. Debido a que los antígenos de membrana en la superficie celular necesitan ser neutralizados, los anticuerpos tienen que unirse fuertemente a los antígenos al pH de la superficie celular, es decir pH 7,4. Debido a que el pH intraendosomal ha sido informado generalmente entre pH 5,5 y 6,0 (Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2004 Feb; 5(2): 121-32), un anticuerpo que se una débilmente a un antígeno a pH entre 5,5 y 6,0, se considera que se disocia del antígeno bajo condiciones ácidas intraendosomales. Más específicamente, una única molécula de IgG que se une fuertemente a un antígeno a un pH de superficie celular de 7,4 y que se une débilmente al antígeno al pH intraendosomal de entre 5,5 y 6,0 puede tener la capacidad de neutralizar múltiples antígenos y por lo tanto mejorar la farmacocinética.

En general, las interacciones proteína-proteína son interacciones hidrofóbicas, interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno, y la fuerza de unión generalmente se expresa como una constante de unión (afinidad) o constante de unión aparente (avidez). La unión dependiente de pH, cuya fuerza de unión varía entre condiciones neutras (pH 7,4) y condiciones ácidas (pH entre 5,5 y 6,0), se encuentra presente en interacciones proteína-proteína de origen natural. Por ejemplo, la unión mencionada anteriormente entre moléculas de IgG y FcRn conocido como un receptor salvaje para moléculas de IgG es fuerte bajo condiciones ácidas (pH entre 5,5 y 6,0) pero notablemente débil bajo condiciones neutras (pH 7,4). La mayoría de esas interacciones proteína-proteína que cambian dependiendo del pH, se encuentran asociadas con residuos de histidina. Dado que el pKa del residuo de histidina se encuentra en la cercanía de pH entre 6,0 y 6,5, el estado de disociación de protón de los residuos de

histidina varía entre condiciones neutras (pH 7,4) y condiciones ácidas (pH entre 5,5 y 6,0). Específicamente, los residuos de histidina no están cargados y funcionan como aceptores de átomos de hidrógeno bajo condiciones neutras (pH 7,4), mientras que se vuelven positivamente cargados y funcionan como donores de átomos de hidrógeno bajo condiciones ácidas (pH entre 5,5 y 6,0). Se ha informado que la unión dependiente de pH de la interacción IgG-FcRn mencionada anteriormente también está asociada con los residuos de histidina presente en IgG (Mol. Cell. 2001 Apr; 7(4): 867-77).

Por lo tanto, la dependencia de pH se puede impartir a las interacciones proteína-proteína por sustitución de un residuo aminoácido involucrado en las interacciones proteína-proteína con un residuo de histidina, o por introducción de una histidina en un sitio de interacción. Dichos intentos también han sido hechos en interacciones proteína-proteína entre anticuerpos y antígenos, y se ha adquirido exitosamente un anticuerpo mutante con la habilidad de unión a antígeno disminuida bajo condiciones ácidas por introducción de histidina en la secuencia CDR de un anticuerpo anti-lisosima de clara de huevo (FEBS Letter (vol. 309, No. 1, 85-88, 1992)). Adicionalmente, se ha informado un anticuerpo preparado por introducción de histidina en su secuencia CDR y específicamente se une a un antígeno a bajos pH de tejidos cancerígenos pero que se une débilmente bajo condiciones neutras (WO 2003-105757).

A pesar que se han informado métodos para la introducción de dependencia de pH en reacciones antígeno-anticuerpo tal como se describe anteriormente, no se han informado moléculas de IgG que cada una neutralice múltiples antígenos por unión fuerte a antígenos a pH 7,4 de fluido corporal de 7,4 pero por unión débil a antígenos al pH intraendosomal de entre 5,5 y 6,0. En otras palabras, no ha habido informes relacionados a modificaciones que reduzcan significativamente la unión bajo condiciones ácidas a la vez que mantengan la unión bajo condiciones neutras tal que en comparación con un anticuerpo no modificado, un anticuerpo modificado se une múltiples veces *in vivo* a antígenos y por lo tanto muestra farmacocinética mejorada así como duración mejorada del efecto neutralizante a la misma dosis.

El receptor de IL-6 está presente en el cuerpo en la forma de receptor soluble de IL-6 o receptor de membrana de IL-6 (Nat. Clin. Pract. Rheumatol. 2006 Nov; 2(11): 619-26). Los anticuerpos anti-receptor de IL-6 se unen al receptor soluble de IL-6 y al

receptor de membrana de IL-6, y neutralizan su actividad biológica. Se considera que, luego de la unión al receptor de membrana de IL-6, los anticuerpos anti-receptor de IL-6 se incorporan a endosomas intracelulares por internalización mientras están unidos al receptor de IL-6 de membrana, luego se mueven dentro de lisosomas mientras que los anticuerpos se mantienen unidos al receptor de membrana de IL-6, y sufren degradación por lisosomas junto con el receptor de membrana de IL-6. De hecho, se ha informado que un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado exhibe depuración no lineal, y su eliminación dependiente de antígeno contribuye en gran medida a la eliminación del anticuerpo anti-receptor de IL-6 (The Journal of Rheumatology, 2003, 30; 71426-1435). De ese modo, un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado se une a uno o dos receptores de membrana de IL-6 (mono o divalentemente), y luego se internaliza y se degrada en lisosomas. Por lo tanto, si es posible producir anticuerpos modificados que exhiben habilidad de unión reducida en gran medida bajo condiciones ácidas pero retienen la misma habilidad de unión como el anticuerpo de tipo salvaje anti-receptor de IL-6 humanizado bajo condiciones neutras (anticuerpo anti-receptor de IL-6 con unión dependiente de pH), se pueden neutralizar múltiples receptores de IL-6 con un único anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado. Por lo tanto, en comparación con los anticuerpos del tipo salvajes anti-receptor de IL-6 humanizado, los anticuerpos anti-receptor de IL-6 con unión dependiente de pH pueden mejorar la duración del efecto neutralizante *in vivo* a la misma dosis.

Producción de anticuerpo humanizado anti-receptor de IL-6 con unión dependiente de pH H3pI/L73:

La introducción de histidina en un CDR ha sido informada como un método para la introducción de unión dependiente de pH a reacciones antígeno-anticuerpo (FEBS Letter (vol. 309, No. 1, 85-88, 1992)). Con el objetivo de encontrar residuos aminoácidos expuestos en la superficie de la región variable de H53/PF1L producido en el ejemplo 1 y residuos posibles interaccionando con el antígeno, se creó un modelo de región Fv de H53/PF1L por modelado por homología usando el programa de computación MOE (Chemical Computing Group Inc.). Se usó un modelo tridimensional en base a la información de secuencia de H53/PF1L para seleccionar H27, H31, H35, L28, L32 y L53 (Kabat numbering, Kabat, E.A. et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological

Interest, NIH) como sitios de mutación que pueden introducir unión a antígeno dependiente de pH por introducción de histidina. El producto en el cual los residuos en H27, H31 y H35 en H53 producido en el ejemplo 1 se sustituyeron por histidinas se designó como H3pl (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 3), y el producto en el cual los residuos en L28, L32 y L53 en PF1L producido en el ejemplo 1 se sustituyeron por histidinas se designó como L73 (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 6).

Producción, expresión y purificación del vector de expresión H3pl/L73

La modificación de aminoácidos se llevó a cabo para producir anticuerpos modificados en los sitios seleccionados. Las mutaciones se introdujeron en H53 (secuencia de nucleótidos: SEQ ID N° 13) y PF1L (secuencia de nucleótidos: SEQ ID N° 14) producidos en el ejemplo 1 para producir H3pl (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 3) y L73 (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 6). Más específicamente, el conjunto de elementos QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) se usó de acuerdo al método descrito en las instrucciones provistas, y los fragmentos plásmido resultantes se insertaron en un vector de expresión en células mamíferas para producir el vector de expresión de cadena H deseado y el vector de expresión de cadena L. Las secuencias de nucleótidos de los vectores de expresión resultantes se determinaron usando un método conocido por personas con experiencia en el arte. Se expresó H3pl/L73 que usa H3pl para la cadena H y L73 para la cadena L y se purificó por el método descrito en el ejemplo 1.

EJEMPLO 3: Otorgamiento de la habilidad de unión a antígeno dependiente de pH por modificación de His de CDR usando tecnología de expresión en fagos

Producción de molécula scFv de anticuerpo PM1 humanizado

El anticuerpo PM1 humanizado, que es un anticuerpo humanizado anti-IL-6R (Cancer Res. 1993 Feb 15; 53(4): 851-6), se convirtió en scFv. Las regiones VH y VL se amplificaron por PCR, y se produjo el PM1 HL scFv humanizado que tiene la secuencia conectora GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO. 15) entre VH y VL.

Selección de posiciones capaces de introducir histidina por búsqueda de histidinas

Se realizó una PCR usando el ADN de PM1 HL scFv humanizado producido como un molde para producir una biblioteca de histidina en la cual cada uno de los aminoácidos CDR se reemplazó por histidina. Las porciones de la biblioteca se

construyeron por PCR usando cebadores en los cuales el codón de un aminoácido deseado para ser mutado para la biblioteca se reemplazó por CAT, un codón correspondiente a histidina, y se construyeron otras porciones por PCR normal. Estas porciones luego se unieron por PCR solapante. La biblioteca construida se digirió con Sfil, se insertó en un vector fagémido pELBG lacI que también se digirió con Sfil, y luego se usó para transformar XL1-Blue (Stratagene). Las colonias resultantes se usaron para evaluar la unión de antígeno por ELISA con fagos y se analizó la secuencia de HL scFv. El ELISA con fagos se llevó a cabo usando una placa recubierta con SR344 a 1 µg/ml de acuerdo con J. Mol. Biol. 1992; 227: 381-388. Los clones que se encontraron que se unieron a SR344 se sometieron al análisis de secuencia usando cebadores específicos.

Se determinó el título de fagos por ELISA con un anticuerpo anti-Etag (GE Healthcare) y anticuerpo anti-M13 (GE Healthcare). Este valor luego se usó para seleccionar las posiciones donde la sustitución del residuo CDR con histidina no alteró significativamente la capacidad de unión en comparación con PM1 HL scFv humanizado, en base a los resultados de ELISA con fagos para SR344. Las posiciones seleccionadas se muestran en la tabla 2. La numeración de cada residuo se hizo de acuerdo a la numeración de Kabat (Kabat, et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH).

[Tabla 2] Posiciones de sustituciones de histidina que no afectan significativamente la capacidad de unión

H31, H50, H54, H56, H57, H58, H59, H60, H61, H62, H63, H64, H65, H100a, H100b, H102

L24, L26, L27, L28, L30, L31, L32, L52, L53, L54, L56, L90, L92, L93, L94

Construcción de biblioteca de CDR con modificación de histidina

Se diseñó una biblioteca en la cual los aminoácidos de los residuos de CDR que no alteraron significativamente la capacidad de unión cuando se sustituyeron por histidina como se muestra en la tabla 2 (posiciones capaces de introducir histidina) son su secuencia original (secuencia del tipo salvaje) o histidina. La biblioteca se construyó en base a las secuencias de la cadena H PF1H y la cadena L PF1L producidas en el ejemplo 1 tal que las posiciones mutadas para la biblioteca representaron las secuencias originales o histidinas (tanto las secuencias originales o histidinas).

Las porciones de la biblioteca se construyeron por PCR usando cebadores que fueron diseñados tal que una posición deseada para ser mutado para la biblioteca representó el codón de aminoácido original o codón de histidina, y se produjeron otras porciones por PCR normal, o por PCR usando cebadores sintéticos como en las porciones de la biblioteca. Estas porciones luego se unieron por PCR solapante (J. Mol. Biol. 1996; 256: 77-88).

Esta biblioteca se usó para construir una biblioteca de expresión en ribosoma de acuerdo a J. Immunological Methods 1999; 231: 119-135. Con el objetivo de llevar a cabo la traducción *in vitro* libre de células de *Escherichia coli*, se agregó una secuencia SDA (sitio de unión a ribosoma) y promotor T7 al extremo 5', y se ligó una secuencia parcial gene3 como conector para la expresión en ribosoma al extremo 3' usando Sfil. Obtención de scFv de unión dependiente de pH a partir de biblioteca por cribado con perlas

Con el objetivo de concentrar sólo scFv que tiene la capacidad de unirse a SR344, se llevó a cabo el cribado dos veces por el método de expresión en ribosoma de acuerdo a Nature Biotechnology 2000 Dec; 18: 1287-1292. El SR344 preparado se biotiniló usando NHS-PEO4-Biotina (Pierce) para obtener un antígeno. El cribado se llevó a cabo usando 40 nM del antígeno biotinilado.

Usando la mezcla de ADN resultante como molde, se recuperó HL scFv por PCR usando cebadores específicos. Luego de la digestión con Sfil, el HL scFv digerido se insertó en un vector fagémido pELBG lacI que también fue digerido con Sfil, y luego se usó para transformar XL1-Blue (Stratagene).

Se hicieron crecer células *Escherichia coli* que llevaban el plásmido deseado hasta entre 0,4 y 0,6 D.O./ml en medio 2YT conteniendo 100 µg/ml de ampicilina y 2% de glucosa. A esto se agregó un fago auxiliar (M13KO7, $4,5 \times 10^{11}$ pfu), se cultivó en forma estática durante 30 minutos a 37°C, y luego se cultivó con agitación durante 30 minutos a 37°C. el cultivo se transfirió a un tubo Falcon de 50 ml, se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm, se resuspendió en medio 2YT conteniendo 100 µg/ml de ampicilina, 25 µg/ml de kanamicina, y 0,5 mM de IPTG, y luego se incubó durante la noche a 30°C.

El cultivo incubado durante la noche se precipitó con 2,5 M de NaCl y 10% de PEG, y luego se diluyó con PBS para obtener una solución biblioteca de fagos. Se agregó 10% de M-PBS (PBS conteniendo 10% de leche descremada) y 1 M de Tris-HCl a la solución de biblioteca de fagos a concentración final de 2,5% M-PBS y pH 7,4. El cribado se llevó a cabo por un método de cribado típico usando un antígeno inmovilizado sobre perlas magnéticas (J. Immunol. Methods 2008 Mar 20; 332(1-2): 2-9; J. Immunol. Methods 2001 Jan 1; 247(1-2): 191-203; Biotechnol. Prog. 2002 Mar-Apr; 18(2): 212-20). Más específicamente, se agregaron 40 pmol de SR344 marcado con biotina a la biblioteca de fagos y la biblioteca se puso en contacto con el antígeno durante 60 minutos a 37°C. Las perlas recubiertas con estreptavidina (Dynal M-280) lavadas con 5% de M-PBS (PBS conteniendo 5% de leche descremada) se agregaron y se dejaron unir durante 15 minutos a 37°C. Las perlas se lavaron cinco veces con 0,5 ml de PBST (PBS conteniendo 0,1% de Tween-20, pH 7,4) y PBS (pH 7,4). Las perlas se suspendieron en 1 ml de PBS (pH 5,5) a 37°C, y se recuperó el fago inmediatamente. La solución de fagos recuperados se agregó a 10 ml de XL1-Blue en fase logarítmica de crecimiento (OD600 entre 0,4 y 0,5) y se dejó reposar durante 30 minutos a 37°C para la infección. Las *E. coli* infectadas se plaquearon sobre una placa de 225 mm x 225 mm conteniendo 2 YT, 100 µg/ml de ampicilina y 2% de glucosa. Estas *E. coli* se usaron para comenzar el cultivo de fagos adicional del mismo modo como se describió anteriormente y repetir el cribado 8 veces.

Evaluación por ELISA con fagos

Las colonias únicas de más arriba se inocularon en 100 µL de 2YT, 100 µg/ml de ampicilina, 2% de glucosa y 12,5 µg/ml de tetraciclina y se cultivaron durante la noche a 30°C. Se inocularon 2 µL de este cultivo en 300 µL de 2YT, 100 µg/ml de ampicilina y 2% de glucosa, y luego se cultivaron durante 4 horas a 37°C. Se agregó un fago auxiliar (M13KO7) al cultivo a 9×10^8 pfu, se dejó reposar durante 30 minutos a 37°C y luego se agitó durante 30 minutos a 37°C para la infección. Posteriormente, el medio se reemplazó con 300 µL de 2 YT, 100 µg/ml de ampicilina, 25 µg/ml de kanamicina, y 0,5 mM de IPTG. Luego del cultivo durante la noche a 30°C, se recuperó el sobrenadante centrifugado. Se agregaron 360 µL de 50 mM de PBS (pH 7,4) a 40 µL del sobrenadante centrifugado y se sometió a ELISA. Se recubrió una placa de microtitulación StreptaWell

de 96 pocillos (Roche) durante la noche con 100 μ L de PBS conteniendo 62,5 ng/ml de SR344 marcado con biotina. Luego de eliminar el antígeno por lavado con PBST, se bloqueó con 250 μ L de 2% de BSA-PBS durante 1 hora o más. Luego de eliminar el 2% de BSA-PBS, se agregó el sobrenadante del cultivo preparado y se dejó reposar durante 1 hora a 37°C para la unión del anticuerpo. Luego del lavado, se agregó 50 mM de PBS (pH 7,4) o 50 mM de PBS (pH 5,5) y se incubó en reposo durante 30 minutos a 37°C. Luego del lavado, se llevó a cabo la detección con un anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP (Amersham Pharmacia Biotech) diluido con 2% de BSA-PBS y solución simple de TMB (Zymed), seguido por el agregado de ácido sulfúrico para detener la reacción, y la medida de absorbancia a 450 nm.

Sin embargo, no se obtuvieron clones que exhibieran una potente capacidad de unión dependiente de pH con este cribado usando el antígeno inmovilizado sobre perlas magnéticas. Los clones que se encontró que mostraron débil capacidad de unión dependiente de pH se sometieron al análisis de secuencia usando cebadores específicos. Las posiciones en estos clones en donde la histidina estaba presente en alta tasa se muestran en la tabla 3.

[Tabla 3] Posiciones de sustituciones de histidina detectadas con biblioteca de fagos (cribado con perlas magnéticas)

H50, H58, H61, H62, H63, H64, H65, H102

L24, L27, L28, L32, L53, L56, L90, L92, L94

Obtención de scFv de unión dependiente de pH a partir de biblioteca por cribado en columna

No se obtuvieron clones que tuvieran fuerte capacidad de unión dependiente de pH por cribado típico usando el antígeno inmovilizado en perlas magnéticas. Esto puede deberse a las siguientes razones. En el cribado usando el antígeno inmovilizado sobre perlas magnéticas o una placa, se colectan todos los fagos disociados de las perlas magnéticas o placa bajo condiciones ácidas. Por lo tanto, los clones de fagos que tienen débil dependencia con el pH, recuperados juntos, reducen la probabilidad de que se incluyan los clones que tienen fuerte dependencia con el pH en los clones finalmente concentrados.

Por lo tanto, se examinó el cribado usando una columna inmovilizada con un antígeno como un método de cribado más riguroso (Fig. 5). No ha habido informes previos sobre la obtención de clones que son capaces de unión dependiente del pH usando cribado con una columna con antígeno inmovilizado. En el cribado usando una columna con el antígeno, cuando los fagos que no han sido unidos bajo condiciones neutras se eluyen bajo condiciones ácidas, los clones que tienen baja dependencia con el pH se vuelven a unir al antígeno en la columna y por lo tanto se eluyen menos, permitiendo que los clones que tienen fuerte dependencia con el pH se vuelvan a unir menos en la columna para ser eluidos selectivamente de la columna. Adicionalmente, a pesar que "todos" los fagos que se han disociado bajo condiciones ácidas se recuperan en el cribado usando el antígeno inmovilizado sobre perlas magnéticas o una placa, el cribado usando una columna inmovilizada con el antígeno permite la recuperación selectiva de fagos que tienen capacidad de unión con fuerte dependencia con el pH por permitir que fluya una solución amortiguadora ácida a través de la columna para empezar la elusión y recuperar sólo las "fracciones apropiadas".

Primero, se preparó una columna en la cual se inmovilizó el antígeno SR344. Se lavaron 200 µl de Streptavidin Sepharose (GE Healthcare) con 1 ml de PBS, se suspendieron en 500 µL de PBS, y se pusieron en contacto con 400 pmol de SR344 marcado con biotina durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, una columna vacía (Amersham Pharmacia Biotech) se rellenó con la anterior sefarosa y se lavó con aproximadamente 3 ml de PBS. Los fagos de biblioteca precipitados con PEG mencionados anteriormente se diluyeron a 1/25 con 0,5% de BSA-PBS (pH 7,4), se hicieron pasar a través de un filtro de 0,45 µm, y luego se agregaron a la columna. Luego del lavado con aproximadamente 6 ml de PBS (pH 7,4), se dejó fluir 50 mM de MES-NaCl (pH 5.5) a través de la columna para eluir los anticuerpos que se disocian a pH bajo. Las fracciones eluidas apropiadas se colectaron, y se agregó la solución de fagos recuperada a 10 ml de XL1-Blue en fase de crecimiento logarítmico (OD₆₀₀ entre 0,4 y 0,5) y se dejó reposar durante 30 minutos a 37°C.

Las *E. coli* infectadas se plaquearon sobre placas de 225 mm x 225 mm conteniendo 2YT, 100 µg/ml de ampicilina, y 2% de glucosa. Estas *E. coli* se usaron para

comenzar el cultivo de fagos adicional del mismo modo que se describió anteriormente y se repitió el cribado 6 veces.

Evaluación por ELISA con fagos

Los fagos resultantes se evaluaron por ELISA con fagos. Los clones que se encontró que tuvieron fuerte dependencia con el pH se sometieron al análisis de secuencia usando cebadores específicos. Como resultado, se obtuvieron varios clones que mostraron unión dependiente del pH en comparación con WT. Tal como se muestra en la Fig. 6, se encontró que el clon CL5 (cadena H: CLH5, cadena L: CLL5) (CLH5: secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 5, CLL5: secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 8) exhibe una unión con una particularmente fuerte dependencia del pH en comparación con WT. Así se confirmó que los anticuerpos que exhibieron unión con fuerte dependencia con el pH, mientras que no es posible obtenerlos por cribado típico usando el antígeno inmovilizado sobre perlas magnéticas, se pueden obtener por cribado usando una columna inmovilizada con el antígeno. Por lo tanto, se encontró que el cribado usando una columna con antígeno inmovilizado es un método altamente eficaz para obtener anticuerpos con unión dependiente con el pH a partir de una biblioteca. Se analizaron las secuencias de aminoácidos de los clones que mostraron una unión dependiente del pH, y las posiciones donde estuvo presente histidina con una alta probabilidad en los clones concentrados se muestran en la tabla 4.

[Tabla 4] Posiciones de sustitución de histidina encontradas por biblioteca de fagos (cribado por columna)

H31, H50, H58, H62, H63, H65, H100b, H102

L24, L27, L28, L32, L53, L56, L90, L92, L94

EJEMPLO 4: Expresión y purificación de anticuerpo humanizado contra receptor de IL-6 histidina modificado

Producción, expresión y purificación de vector de expresión de anticuerpo humanizado contra receptor de IL-6 histidina modificado

Con el objetivo de convertir los clones que mostraron fuerte dependencia con el pH en ELISA con fagos a IgG, VH y VL se amplificaron respectivamente por PCR, se digirieron con XhoI/NheI y EcoRI, se insertaron en un vector de expresión en células mamíferas. La secuencia de nucleótidos de cada fragmento de ADN se determinó por un

método conocido por las personas con experiencia en el arte. Se expresó CLH5/L73, en el cual CLH5 se usó para la cadena H y L73 obtenido en el ejemplo 2 se usó para la cadena L, y se purificó como IgG. La expresión y purificación se llevó a cabo por el método descrito en el ejemplo 1.

Se produjo un anticuerpo con una dependencia aun mayor con el pH por combinación de sitios de mutación. En base a las localizaciones donde His se concentró en la biblioteca de fagos así como la información estructural y similares, se sustituyeron por histidina H32, H58, H62 y H102 en H3pl que fue obtenido como una cadena H en el ejemplo 2, y adicionalmente se sustituyeron H95 y H99 por valina e isoleucina, respectivamente, para producir H170 (SEQ ID N° 4). La producción de variante se llevó a cabo usando el método descrito en el ejemplo 1. Adicionalmente, se produjo L82 (SEQ ID N° 7) por sustitución por ácido aspártico de la 28^{va} histidina de L73 que se produjo como una cadena L en el ejemplo 2. La producción de variante se llevó a cabo usando el método descrito en el ejemplo 1. Se expresó H170/L82, en donde H170 se usó para la cadena H y L82 se usó para la cadena L, y se purificó como IgG usando el método descrito en el ejemplo 1.

EJEMPLO 5: Evaluación de la actividad neutralizante del IL-6R del anticuerpo con unión dependiente de pH

Evaluación de la actividad neutralizante del receptor de IL-6 humano de clones convertidos a IgG

La actividad neutralizante del receptor de IL-6 se evaluó para cuatro anticuerpos: anticuerpo PM1 humanizado (WT) y H3pl/L73, CLH5/L73 y H170/L82 producidos en los ejemplos 2 y 4.

Más específicamente, se evaluó la actividad neutralizante del receptor de IL-6 usando BaF3/gp130 que exhibe crecimiento dependiente de IL-6/receptor de IL-6. BaF3/gp130 se lavó tres veces con medio RPMI1640 conteniendo 10% de FBS, luego se suspendió a 5×10^4 células/ml en medio RPMI1640 conteniendo 60 ng/ml de interleuquina-6 humana (Toray), 60 ng/ml de receptor de IL-6 humano soluble recombinante (SR344) y 10% de FBS. Se dispensaron 50 μ L de la suspensión en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Corning). Luego, el anticuerpo purificado se diluyó con RPMI1640 conteniendo 10% de FBS, y se mezclaron 50 μ L del anticuerpo en cada

pocillo. Luego de cultivar durante 3 días a 37°C y 5% de CO₂, se diluyó dos veces el reactivo WST-8 (Cell Counting Kit-8, Dojindo Laboratories) con PBS y se agregó a 20 µL/pocillo, y luego se midió inmediatamente la absorbancia a 450 nm (longitud de onda de referencia: 620 nm) usando Sunrise Classic (Tecan). Luego de cultivar durante 2 horas, se midió nuevamente la absorbancia a 450 nm (longitud de onda de referencia: 620 nm). La actividad neutralizante del receptor de IL-6 se evaluó en base al cambio en absorbancia luego de 2 horas. Como resultado, tal como se muestra en la Fig. 7, H3pl/L73, CLH5/L73 y H170/L82 mostraron que tienen actividad de neutralización biológica equivalente en comparación con el anticuerpo PM1 humanizado (WT).

EJEMPLO 6: Análisis por Biacore del anticuerpo con unión dependiente del pH

Análisis de la unión de clones con unión dependiente del pH a receptor de IL-6 soluble

Se llevó a cabo el análisis cinético de las reacciones antígeno-anticuerpo a pH 5,8 y pH 7,4 usando Biacore T100 (GE Healthcare) en los cuatro anticuerpos: anticuerpo PM1 humanizado (WT) y H3pl/L73, CLH5/L73, y H170/L82 producidos en los ejemplos 2 y 4 (solución amortiguadora: 10 mM de MES (pH 7,4 o pH 5,8), 150 mM de NaCl, y 0,05% de Tween 20). Se unieron diferentes anticuerpos sobre un chip sensor inmovilizados con proteína A/G recombinante (Pierce) por acoplamiento por amina. Se inyectó SR344 ajustado a concentraciones de entre 9,8 y 400 nM al chip como un analito. Se observe en tiempo real la asociación y disociación de los clones con unión dependiente de pH a SR344 (figuras 8 y 9). Todas las medidas se llevaron a cabo a 37°C. Las constantes de velocidad de asociación k_a (1/Ms) y constantes de velocidad de disociación k_d (1/s) se calcularon usando el programa de computación Biacore T100 Evaluation (GE Healthcare), y las constantes de disociación K_D (M) se calcularon en base a aquellos valores (tabla 5). Más aun, se calculó la relación de las afinidades a pH 5,8 y pH 7,4 para cada clon para evaluar la unión dependiente de pH. Todas las medidas se llevaron a cabo a 37°C.

Como resultado del cálculo de la relación de afinidad entre pH 5,8 y pH 7,4 para cada clon, la unión dependiente de pH (afinidad) de H3pl/L73, H170/L82 y CLH5/L73 a SR344 fue 41 veces, 394 veces y 66 veces, respectivamente, cada uno mostrando una unión dependiente de pH más de 15 veces mayor que WT.

Los anticuerpos anti-receptor de IL-6 que se unen fuertemente al antígeno al pH 7,4 del plasma pero que se unen débilmente al antígeno al pH de entre 5,5 y 6,0 intraendosomal aun no han sido informados. En este estudio, se obtuvieron anticuerpos que conservaron una actividad de neutralización biológica equivalente a la del anticuerpo WT humanizado contra el receptor de IL-6 y la afinidad a pH 7,4, pero que exhiben afinidad a pH 5,8 que ha sido específicamente disminuida más de 10 veces.

[Tabla 5] Comparación de la unión al receptor soluble de IL-6 de los clones con unión dependiente de pH dirigidos contra SR344

	pH7.4			pH5.8			KD(pH5.8)/KD(pH7.4)
	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	
WT	5.1E+05	1.0E-03	2.1E-09	7.6E+05	3.8E-03	5.0E-09	2.4
H3pl/L73	5.4E+05	7.4E-04	1.4E-09	1.7E+05	9.7E-03	5.7E-08	41.3
H170/L82	6.8E+05	1.1E-03	1.6E-09	2.6E+04	1.7E-02	6.4E-07	393.5
CLH5/L73	7.1E+05	7.9E-04	1.1E-09	3.8E+05	2.8E-02	7.4E-08	66.1

Análisis de la unión de clones con unión dependiente del pH al receptor de membrana de IL-6

Se observaron las reacciones antígeno-anticuerpo al receptor de IL-6 de membrana a pH 5,8 y pH 7,4 de los clones con unión dependiente de pH producidos anteriormente. La unión al receptor de IL-6 de membrana se evaluó por evaluación de la unión al receptor de IL-6 inmovilizado sobre un chip sensor. Se biotiniló SR344 de acuerdo al método conocido por personas con experiencia en el arte, y el SR344 biotinilado se inmovilizó sobre el chip sensor por medio de estreptavidina utilizando la afinidad entre estreptavidina y biotina. Todas las medidas se llevaron a cabo a 37°C, y la solución amortiguadora de fase móvil consistió de 10 mM de MES (pH 5,8), 150 mM de NaCl y 0,05% de Tween 20. Los clones con unión dependiente de pH se inyectaron bajo la condición de pH 7,4 y se permitió que se unieran a SR344 (solución amortiguadora de inyección de muestra: 10 mM de MES (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 0,05% de Tween 20), y se observó la disociación dependiente de pH de cada clon en la fase móvil con pH de 5,8 (Fig. 10).

La velocidad de disociación ($k_d(1/s)$) a pH 5,8 se calculó usando el programa de computación Biacore T100 Evaluation (GE Healthcare) por ajuste sólo de la fase de disociación a pH 5,8, donde 0,5 µg/ml de la muestra se unió en 10 mM de MES (pH 7,4), 150 mM de NaCl, y 0,05% de Tween 20, y se disoció en 10 mM de MES (pH 5,8), 150

mM de NaCl, y 0,05% de Tween 20. Similarmente, la velocidad de disociación ($k_d(1/s)$) a pH 7,4 se calculó usando el programa de computación Biacore T100 Evaluation (GE Healthcare) por ajuste sólo de la fase de disociación a pH 7,4, donde 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de la muestra se unió en 10 mM de MES (pH 7,4), 150 mM de NaCl, y 0,05% de Tween 20, y se disoció en 10 mM de MES (pH 7,4), 150 mM de NaCl, y 0,05% de Tween 20. La constante de velocidad de disociación dependiente de pH de cada clon se muestra en la tabla 6.

[Tabla 6] Comparación de la constante de velocidad de disociación de los clones de unión dependiente de pH dirigido contra SR344 del receptor de membrana de IL-6

	kd(1/s)		Relación kd
	pH7.4	pH5.8	pH5.8/pH7.4
WT	4.84E-04	7.15E-04	1.5
H3pl/L73	3.44E-04	3.78E-03	11.0
H170/L82	7.70E-04	1.44E-03	1.9
CLH5/L73	1.04E-03	5.67E-03	5.5

La mayor dependencia del pH de velocidad de disociación se observó en H3pl/L73 seguido por CLH5/L73 y H170/L82 en orden descendiente, y cada clon demostró una mayor disociación dependiente de pH del receptor de IL-6 de membrana que WT. Sin embargo, el grado de asociación/disociación dependiente de pH fue diferente entre el receptor de IL-6 soluble y el receptor de IL-6 de membrana. Se reveló que H170/L82, que mostró la mayor unión dependiente de pH en el análisis de unión al receptor soluble de IL-6, mostró la menor unión dependiente de pH en el análisis de unión al receptor de IL-6 de membrana. En general, se conoce que mientras que las moléculas de IgG se unen en forma monovalente a antígenos solubles (afinidad), se unen en forma divalente a antígenos de membrana (avidez). Se sugiere que esta diferencia en el modo de unión entre los antígenos solubles y antígenos de membrana influye en la unión dependiente de pH de H170/L82.

EJEMPLO 7: Confirmación de unión múltiple a antígeno por anticuerpo con unión dependiente de pH

Como se describe en el ejemplo 2, los anticuerpos con unión dependiente de pH pueden ser capaces de unirse a antígenos múltiple veces. Específicamente, un

anticuerpo con unión dependiente de pH que se ha unido a un antígeno es incorporado inespecíficamente a endosomas, pero se disocian del antígeno soluble bajo condiciones ácidas intraendosomales. El anticuerpo se une a FcRn y de este modo regresa al plasma. Debido a que el anticuerpo que ha regresado al plasma no está unido al antígeno, tiene la capacidad de unirse nuevamente a un nuevo antígeno. La repetición de este proceso permite que los anticuerpos con unión dependiente de pH se unan a antígenos múltiples veces. Sin embargo, para anticuerpos IgG que no tienen capacidad de unión dependiente de pH, no todos los antígenos se disocian de los anticuerpos bajo las condiciones ácidas intraendosomales. De este modo, dichos anticuerpos que han regresado al plasma por FcRn permanecen unidos al antígeno, y por lo tanto no se pueden unir a nuevos antígenos. Consecuentemente, en casi todos los casos, cada molécula única de anticuerpos IgG tiene la capacidad de neutralizar sólo dos antígenos (en el caso de unión divalente).

Por lo tanto, se evaluó si los tres anticuerpos con unión dependiente de pH (H3pl/L73, CLH5/L73, y H170/L82) construidos en los ejemplos 2 y 4 fueron capaces de unirse al antígeno SR344 múltiples veces en comparación al anticuerpo PM1 humanizado (WT).

Se usó Biacore (GE Healthcare) para evaluar que la unión de anticuerpos a pH 7,4 y disociación a pH 5,8 fue capaz de unirse al antígeno múltiples veces. El anticuerpo a ser evaluado se unió a un chip sensor con proteína A/G recombinante inmovilizada (Pierce) por el método de acoplamiento por amina, y se permitió fluir una fase móvil de pH 7,4 (paso 1). Luego se dejó fluir una solución de SR344 ajustada a pH 7,4 como un analito para unir SR344 al anticuerpo a pH 7,4 (paso 2). Esta unión a pH 7,4 imita la unión de antígeno en plasma. Posteriormente, se agregó solución amortiguadora ajustada a pH 5,8 sola (sin contener SR344) como un analito para exponer el antígeno unido al anticuerpo en condiciones ácidas (paso 3). Esta disociación a pH 5,8 imita el estado de unión de los complejos antígeno-anticuerpo en endosomas. Posteriormente, se repitió el paso 2. Esto imita la nueva unión del anticuerpo que ha regresado al plasma por FcRn a un nuevo antígeno. Posteriormente, se repitió el paso 2 para exponer el complejo anticuerpo-antígeno a las condiciones ácidas. La repetición del “paso 2 al paso 3” múltiples veces a 37°C tal como se describe anteriormente puede imitar el estado *in*

vivo en el cual los anticuerpos son repetidamente incorporados desde el plasma a endosomas por pinocitosis y regresados al plasma por FcRn (Nat. Rev. Immunol. 2007 Sep; 7(9): 715-25).

Se analizaron los clones con unión dependiente de pH producidos descritos anteriormente usando Biacore T100 (GE Healthcare) para su capacidad de unión al antígeno SR344 múltiples veces a pH 5,8 y pH 7,4. Más específicamente, el análisis se llevó a cabo como sigue. Todas las medidas se llevaron a cabo a 37°C. Primero, los anticuerpos muestra descritos anteriormente se unieron sobre un chip sensor con proteína A/G recombinante (Pierce) inmovilizada por acoplamiento por amina, en donde la solución amortiguadora de la fase móvil fue 10 mM de MES (pH 5,8), 150 mM de NaCl, y 0,05% de Tween 20 (paso 1). Se inyectó SR344 ajustado a una concentración de aproximadamente 40 nM como un analito durante 3 minutos a pH 7,4 y se permitió que se una (la solución amortiguadora para el SR344 inyectado fue 10 mM de MES (pH 7,4), 150 mM de NaCl, y 0,05% de Tween 20) (paso 2). Posteriormente, la inyección de SR344 se discontinuó y se permitió que fluyera una fase móvil de pH 5,8 durante aproximadamente 70 segundos para exponer el complejo anticuerpo-SR344 bajo condiciones ácidas (paso 3). Se repitieron continuamente diez conjuntos de este proceso de unión (paso 2)-exposición ácida (paso 3) para observar el sensograma en tiempo real, que se muestra en la Fig. 11. Los WT mostraron menor disociación de SR344 durante la exposición ácida en el paso 3, y por lo tanto la proporción de anticuerpo con capacidad de unirse a nuevos antígenos en el posterior paso 2 fue extremadamente baja. Por otro lado, se encontró que los clones con unión dependiente de pH, particularmente H170/L82 y CLH5/L73, demostraron una disociación tan fuerte durante la exposición ácida en el paso 3 que la mayoría del SR344 unido se disoció, y por lo tanto casi todos los anticuerpos fueron capaces de unirse a nuevos antígenos en el posterior paso 2. En la repetición del 10-conjunto de unión (paso 2) y exposición ácida (paso 3), casi todos los anticuerpos H170/L82 y CLH5/L73 fueron capaces de unirse a nuevos antígenos en cada conjunto.

Los sensogramas obtenidos se usaron para calcular la cantidad de unión de SR344 en cada conjunto para cada muestra usando el programa de computación Biacore T100 Evaluation (GE Healthcare). Los valores integrados en el curso en el

tiempo de los 10 conjuntos se muestran en la Fig. 12. Los valores RU integrados obtenidos en el 10^{mo} conjunto son equivalentes a la cantidad total de antígeno unido durante los diez ciclos. Los clones con unión dependiente de pH, particularmente H170/L82 y CLH5/L73, mostraron la mayor cantidad total de antígeno unido en comparación con WT, y se demostró que fueron capaces de unir repetidamente casi cuatro veces la cantidad de antígeno en comparación con WT. En consecuencia, se puso de manifiesto que confiriéndole la capacidad de unión dependiente del pH a WT, dichos anticuerpos pueden unirse repetidamente a antígenos y de este modo neutralizar múltiples antígenos.

EJEMPLO 8: Ensayo de PK/PD de anticuerpo con unión dependiente de pH usando ratones transgénicos para el receptor de IL-6 humano

Los receptores de IL-6 están presentes en el cuerpo en forma de receptor de IL-6 soluble y en forma de receptor de IL-6 del tipo de membrana (Nat. Clin. Pract. Rheumatol. 2006 Nov; 2(11): 619-26). Los anticuerpos anti-receptor de IL-6 se unen a los receptores solubles de IL-6 y a los receptores del tipo de membrana de IL-6 y neutralizan su acción biológica. Se cree que un anticuerpo anti-receptor de IL-6 se une al receptor del tipo de membrana de IL-6 receptor, es posteriormente incorporado a un endosoma en la célula por internalización mientras que el anticuerpo se mantiene unido al receptor del tipo de membrana de IL-6, y luego se mueve a un lisosoma mientras aun permanece unido al receptor del tipo de membrana de IL-6 donde es degradado por el lisosoma junto con el receptor del tipo de membrana de IL-6. Si H3pI/L73, CLH5/L73, y H170/L82, que son los anticuerpos contra el receptor de IL-6 con unión dependiente de pH evaluados en el ejemplo 6, tiene la capacidad de regresar al plasma por medio de FcRn como resultado de la disociación bajo condiciones ácidas en los endosomas, los anticuerpos que han regresado al plasma pueden unirse a antígenos nuevamente. Esto permite la neutralización de múltiples receptores del tipo de membrana de IL-6 con una única molécula de anticuerpo. Que ocurra el regreso al plasma por medio de FcRn como resultado de la disociación bajo condiciones ácidas en endosomas con los anticuerpos contruidos anti-receptor de IL-6 con unión dependiente de pH o no, se puede determinar por evaluación de si la farmacocinética de estos anticuerpos está mejorada en comparación con la de los WT.

Por lo tanto, se evaluó la farmacocinética en ratones transgénicos para el receptor de IL-6 humano (ratones transgénicos hIL-6R, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995 May 23; 92(11): 4862-6) para cuatro tipos de anticuerpos, es decir, anticuerpo PM1 humanizado (tipo salvaje: WT) y H3pl/L73, CLH5/L73, y H170/L82 contruidos en los ejemplos 2 y 4. Se administró WT, H3pl/L73, CLH5/L73, o H170/L82 en una administración de dosis única intravenosa a ratones transgénicos hIL-6R a 25 mg/kg, y se colectaron muestras de sangre, antes de la administración y durante el tiempo. La sangre colectada se centrifugó inmediatamente durante 15 minutos a 15.000 rpm y 4°C para obtener plasma. El plasma separado se almacenó en un freezer ajustado a -20°C o menos hasta que se llevaron a cabo las medidas.

La medida de la concentración en plasma de ratón se llevó a cabo por ELISA. Las muestras para la calibración se prepararon a concentraciones en plasma de 6,4, 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2 y 0,1 µg/ml. Las muestras de la curva de calibración y las muestras para la medida en plasma de ratón se dispensaron en una inmunoplaaca (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp (Nalge Nunc International)) con anti-IgG humana inmovilizada (cadena y específico) F(ab')₂ (Sigma), y se dejó reposar sin movimiento durante una hora a temperatura ambiente. Se dejó reaccionar secuencialmente anti-IgG-BIOT humano de cabra (Southern Biotechnology Associates) y conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics), y se llevó a cabo una reacción cromogénica usando el sistema BluePhos Microwell Phosphatase Substrates System (Kirkegaard & Perry Laboratories) como sustrato. Se midió la absorbancia a 650 nm con un lector de microplacas. Se calcularon las concentraciones en plasma de ratón con a partir de la absorbancia de la curva de calibración usando el programa de computación analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). Los cursos en el tiempo de la concentración en plasma de WT así como de H3pl/L73, CLH5/L73, y H170/L82 se muestran en la Fig. 13.

La farmacocinética mejoró para todos H3pl/L73, CLH5/L73, y H170/L82 en comparación con WT. En particular, la farmacocinética de H3pl/L73 y CLH5/L73 mejoró considerablemente. Un tipo salvaje de anticuerpo anti-receptor de IL-6 (WT) unido a receptor del tipo de membrana de IL-6 se incorpora en un endosoma en una célula por internalización, se mueve a un lisosoma mientras el anticuerpo se mantiene unido al antígeno, y luego se degrada; por lo tanto, tiene un tiempo de residencia corto en el

plasma. En contraste, debido a que la farmacocinética de los anticuerpos anti-receptor de IL-6 con unión dependiente del pH mejoró considerablemente, se pensó que los anticuerpos anti-receptor de IL-6 con unión dependiente del pH regresaban al plasma nuevamente por medio de FcRn como resultado de la disociación del antígeno, receptor del tipo de membrana de IL-6, bajo condiciones ácidas en los endosomas.

A pesar que la farmacocinética mejoró para cada uno de H3pl/L73, CLH5/L73, y H170/L82 en comparación con WT, el efecto de prolongar el tiempo de persistencia en plasma de H170/L82 fue más débil que el de H3pl/L73 y CLH5/L73. Debido a que las moléculas de IgG se piensa que normalmente se unen en forma divalente al antígeno unido a membrana, se piensa que los anticuerpos anti-receptor de IL-6 también se unen en forma divalente (avidez) a los receptores del tipo de membrana de IL-6 y luego se internalizan. Como se indica en el ejemplo 6, un análisis usando Biacore reveló que H170/L82 se disocia fácilmente del receptor de IL-6 a pH 5,8 durante la unión al receptor de IL-6 soluble (FIG. 9), pero la velocidad de disociación del mismo del receptor de IL-6 a pH 5,8 cuando estaba unido al receptor del tipo de membrana de IL-6 fue extremadamente baja (Fig. 10). A partir de este resultado, la razón del efecto débil de prolongar el tiempo de residencia en plasma de H170/L82 se cree que es porque el anticuerpo no fue capaz de disociarse adecuadamente en los endosomas luego de haber sido internalizado debido a su baja disociación a pH 5,8 durante la unión al receptor del tipo de membrana de IL-6. Es decir, como para el caso de relacionado a los antígenos de membrana, se determinó que para que una única molécula de IgG neutralice múltiples antígenos de membrana, la dependencia con el pH de la disociación de una unión divalente (avidez) es más importante que la dependencia con el pH de la unión monovalente (afinidad).

EJEMPLO 9: ensayo PK/PD de anticuerpos con unión dependiente de pH usando monos macacos

Debido a que la farmacocinética de los anticuerpos anti-receptor de IL-6 de unión dependiente de pH mejoró considerablemente en el ejemplo 8, se piensa que los anticuerpos anti-receptor de IL-6 de unión dependiente de pH regresan al plasma por medio de FcRn como resultado de la disociación del antígeno, receptor del tipo de membrana de IL-6, bajo condiciones ácidas en los endosomas. Si los anticuerpos que

han regresado al plasma se pueden unir a los receptores del tipo de membrana de IL-6 nuevamente, neutralización de un antígeno, receptor del tipo de membrana de IL-6, por anticuerpos anti-receptor de IL-6 de unión dependiente de pH se cree que persiste más que el anticuerpo del tipo salvaje anti-receptor de IL-6, a la misma dosificación. Adicionalmente, debido a que el receptor de IL-6 soluble también está presente entre los receptores de IL-6, la duración de la neutralización se cree que es más larga para la misma dosificación con respecto al receptor de IL-6 soluble por igual.

Se evaluó la farmacocinética en monos macacos para WT y H3pl/L73. Se administró WT o H3pl/L73 a monos macacos con una administración intravenosa de dosis única a 1 mg/kg, y se colectaron muestras de sangre, antes de la administración y durante el tiempo. La sangre colectada se centrifugó inmediatamente durante 15 minutos a 15.000 rpm y a 4°C para obtener plasma. El plasma separado se almacenó en un freezer ajustado a -20°C o menos hasta que se realizaron las medidas.

La medida de la concentración en plasma de monos macacos se llevó a cabo mediante ELISA. Primero, se dispensó fragmento de anticuerpo anti-IgG humana (específico para cadena γ) F(ab')₂ (Sigma) en una Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International) y se dejó reposar inmóvil durante una noche a 4°C para preparar placas con anti-IgG humana inmovilizada. Se prepararon curvas de calibración con concentraciones en plasma de 3,2; 1,6; 0,8; 0,4; 0,2; 0,1 y 0,05 $\mu\text{g/ml}$ y muestras para medida de plasma de monos macacos diluidas 100 veces o más; se agregó 200 μL de 20 ng/ml de IL-6R de mono macaco a 100 μL de cada una de las muestras de la curva de calibración y a las muestras para medida de plasma; y luego, se las dejó reposar inmóviles durante una hora a temperatura ambiente. Subsiguientemente, se dispensaron las muestras en la placa con anti-IgG humana inmovilizada y se dejó reposar inmóvil durante otra hora a temperatura ambiente. Se dejó reaccionar anticuerpo biotinilado anti-IL-6R humano (R&D) durante una hora a temperatura ambiente, y luego se hizo reaccionar Streptavidina-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) durante una hora. Se llevó a cabo una reacción cromogénica usando TMP One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) como sustrato, luego se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 1 N (Showa Chemical) y se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas. Se calcularon las concentraciones en plasma de monos macacos a

partir de la absorbancia de la curva de calibración usando el programa analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). Los cursos temporales de las concentraciones plasmáticas de WT y H3pl/L73 luego de la administración intravenosa se muestran en la FIG. 14. Como resultado, la farmacocinética de H3pl/L73 mejoró considerablemente, en comparación con WT, en monos macacos de la misma manera que en los ratones transgénicos para el receptor de IL-6 humano. Debido a que la farmacocinética de un anticuerpo anti-receptor de IL-6 de unión dependiente del pH, H3pl/L73, mejoró en forma considerable, se pensó que H3pl/L73 retorna al plasma a través de FcRn como resultado de la disociación del antígeno, el receptor de IL-6 de tipo de membrana, bajo las condiciones ácidas que hay dentro de los endosomas.

Con el objetivo de evaluar el grado en el que se neutraliza el receptor de IL-6 de tipo de membrana de mono macaco mediante la administración intravenosa de WT y H3pl/L73, se estudiaron los efectos de los anticuerpos de muestra sobre la proteína C plasmática (CRP) inducida por la IL-6 de mono macaco. Debido a que se secreta CRP cuando la IL-6 se une a los receptores de IL-6 de tipo de membrana, CRP sirve como un indicador de la neutralización de los receptores de IL-6 de tipo de membrana. Se administró IL-6 de mono macaco (cyno.IL-6 preparada como en el Ejemplo 1) con 1% de plasma inactivado de monos macacos en forma subcutánea en el dorso inferior de los animales diariamente a 5 µg/kg entre el día 3 y el día 10 luego de la administración de WT o H3pl/L73. Se colectaron muestras de sangre desde la vena safena inmediatamente antes del comienzo de la administración de IL-6 de mono macaco (día 3) y luego de la administración a intervalos de 24 horas (entre el día 4 y el día 11), y luego se les separó el plasma. Se midieron las concentraciones de CRP de los animales individuales con Cias R CRP (Kanto Chemical) usando un analizador automático (TBA-120FR, Toshiba Medical Systems). Los cursos temporales de la concentración de CRP durante la inducción con IL-6 de *cynomolgus* con respecto a WT y H3pl/L73 se muestran en la FIG. 15. Como resultado, se prolongó la duración de la supresión de CRP considerablemente mediante H3pl/L73 en comparación con WT. En base a este hallazgo, se espera que un anticuerpo anti-receptor de IL-6 de unión dependiente del pH, H3pl/L73, retorne al plasma mediante FcRn como resultado de la disociación de su antígeno, el receptor de IL-6 de tipo de membrana, bajo las condiciones ácidas que hay

dentro de los endosomas; que neutralice al receptor de IL-6 de tipo de membrana mediante su nueva unión con el mismo: y por lo tanto que suprima la producción de CRP durante un periodo de tiempo más largo que WT. En otras palabras, se demostró que H3pl/L73 es capaz de unirse y de neutralizar al receptor de IL-6 de tipo de membrana más de una vez con una sola molécula de anticuerpo. Debido a que la duración de la supresión de la producción de CRP mediante H3pl/L73 es más prolongada en comparación con la de WT, se espera que la duración de tiempo en la cual un antígeno, el receptor de IL-6 de tipo de membrana, está unido a los anticuerpos, sea más prolongada para H3pl/L73 que para WT.

Con el objetivo de evaluar el grado en el cual se neutraliza el receptor soluble de IL-6 de mono macaco mediante la administración intravenosa de WT y H3pl/L73, se midió la concentración de receptor soluble de IL-6 sin unir de mono macaco en plasma de monos macacos. Se adsorbieron todos los anticuerpos de tipo IgG (IgG de mono macaco, anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano, y un complejo de anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano y receptor soluble de IL-6 de mono macaco) presentes en el plasma a Proteína A mediante el agregado de 30 μ L de plasma de monos macacos sobre una cantidad apropiada de resina rProtein A Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) secada en una copa filtrante de 0,22 μ m (Millipore). Luego de centrifugar con una centrífuga de alta velocidad, se recuperó la solución que pasó a través del filtro (un componente denominado "solución de pasada"). Debido a que la solución de pasada no contiene complejo de anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano-receptor soluble de IL-6 de mono macaco unido a la proteína A, se puede medir la concentración de receptor soluble de IL-6 sin unir mediante la medida de la concentración de receptor soluble de IL-6 de mono macaco en la solución de pasada. Se marcó con rutenio al Anticuerpo Monoclonal Anti-IL-6R Humano (R&D) con Sulfo-Tag NHS Ester (Meso Scale Discovery) y se mezcló Anticuerpo Biotinilado Anti-IL-6R Humano (R&D) con las muestras de la curva de calibración de receptor de IL-6 de mono macaco ajustadas a concentraciones de 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, y 62,5 pg/ml y con las muestras de plasma tratadas con Proteína A como se describió previamente, y se dejó que las mezclas reaccionen durante una hora a temperatura ambiente. Subsiguientemente, se agregaron las mezclas a una placa SA-Coated Standard MA2400 de 96 pocillos (Meso Scale

Discovery). Luego de permitir la reacción durante otra hora y de lavar, se agregó Read Buffer T (x4) (Meso Scale Discovery). La medida con el Sector Imager 2400 (Meso Scale Discovery) se llevó a cabo inmediatamente después. Se calcularon las concentraciones de receptor de IL-6 de mono macaco a partir de la respuesta de la curva de calibración mediante el uso del programa analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). Los cursos temporales de las concentraciones de receptor soluble de IL-6 sin unir de mono macaco para WT y H3pl/L73 se muestran en la FIG. 16. Como resultado, la duración de la neutralización del receptor soluble de IL-6 de mono macaco mediante H3pl/L73 fue considerablemente más prolongada en comparación con la de WT. En base a este hallazgo, se espera que el anticuerpo anti-receptor de IL-6 H3pl/L73 de unión dependiente del pH se disocie de su antígeno, el receptor soluble de IL-6, bajo las condiciones ácidas de los endosomas; que retorne al plasma mediante FcRn; y se una y neutralice al receptor soluble de IL-6 nuevamente. Debido a que la duración de la supresión de receptor soluble de IL-6 sin unir de mono macaco mediante H3pl/L73 es prolongada en comparación con la de WT, se espera que la duración de tiempo en la que un antígeno, un receptor soluble de IL-6, esté unido por anticuerpos sea más prolongada para H3pl/L73 que para WT.

A partir de estos hallazgos, se halló que el tiempo hasta que el anticuerpo desaparece del plasma así como también el tiempo en el cual los receptores de IL-6 solubles y de tipo de membrana están unidos por los anticuerpos en el cuerpo, son considerablemente más largos para los anticuerpos anti-receptor de IL-6 de unión dependiente del pH que se hicieron para que se unan fuertemente al antígeno a pH 7,4, que es el pH en el plasma, pero para que se unan débilmente al antígeno a pH 5,8, que es el pH dentro de los endosomas, en comparación con el anticuerpo anti-receptor de IL-6 de tipo salvaje. Esto hace posible reducir la dosificación y la frecuencia de administración a los pacientes, y en consecuencia, la dosis de administración total. Por lo tanto, el anticuerpo anti-receptor de IL-6 de unión dependiente del pH se cree que es particularmente ventajoso como compuesto farmacéutico para usar como antagonista de IL-6.

EJEMPLO 10: Mejora de la Unión Dependiente del pH al Receptor de IL-6 de tipo de membrana mediante la Optimización de la Región Variable

Optimización de las Regiones Variables H3pl/L73 y CLH5/L82

Se demostró que los anticuerpos que tienen habilidades de unión dependientes del pH tienen efectos superiores en el Ejemplo 9. Por lo tanto, para mejorar más aun las habilidades de unión dependientes del pH, se introdujeron mutaciones en la secuencia CDR de CLH5, que se obtuvo en el Ejemplo 3, para construir VH1-IgG1 (SEQ ID N° 21) y VH2-IgG1 (SEQ ID N° 22). Además, se introdujeron mutaciones en la secuencia de marco de trabajo y secuencia CDR de H3pl para construir VH3-IgG1 (SEQ ID N° 23) y VH4-IgG1 (SEQ ID N° 24) con cadenas H modificadas. Se introdujeron mutaciones en las secuencias CDR de L73 y L82 para construir VL1-CK (SEQ ID N° 25), VL2-CK (SEQ ID N° 26), y VL3-CK (SEQ ID N° 27) con cadenas L modificadas. Más específicamente, se construyeron mutantes usando el QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) de acuerdo al método que se describe en las instrucciones adjuntas, y se insertaron los fragmentos de plásmidos resultantes en un vector de expresión en células de mamífero para construir los vectores de expresión de cadena H y los vectores de expresión de cadenas L deseados. Se determinaron las secuencias nucleotídicas de los vectores de expresión resultantes mediante los métodos conocidos entre los expertos en la materia.

El que tiene VH2-IgG1 (SEQ ID N° 22) como cadena H y VL2-CK (SEQ ID N° 26) como cadena L se denominó como Fv1-IgG1, el que tiene VH1-IgG1 (SEQ ID N° 21) como cadena H y L82 como cadena L se denominó como Fv2-IgG1, el que tiene VH4-IgG1 (SEQ ID N° 24) como cadena H y VL1-CK (SEQ ID N° 25) como cadena L se denominó como Fv3-IgG1, y el que tiene VH3-IgG1 (SEQ ID N° 23) como cadena H y VL3-CK (SEQ ID N° 27) como cadena L se denominó como Fv4-IgG1. Entre estos, Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1 se expresaron y purificaron. La expresión y purificación se llevaron a cabo mediante el método que se describe en el Ejemplo 1.

Análisis de Unión de Clones de Unión Dependiente del pH a Receptor Soluble de IL-6

Se llevó a cabo un análisis de la cinética de las reacciones antígeno-anticuerpo a pH 7,4 sobre los cuatro tipos de anticuerpo que son anticuerpos PM1 humanizados (de tipo salvaje: WT) y WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1, y Fv4-IgG1 contruidos en los Ejemplos 2 y 10, mediante el uso de Biacore T100 (GE Healthcare) (amortiguador: MES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05%). Se unió cada anticuerpo sobre un

chip sensor en donde estaba inmovilizado anti-IgG específico de cadena γ F(ab)₂ (Pierce) mediante el método de acoplamiento con aminas, y se inyectó como analito SR344 ajustado a una concentración de entre 9,8 y 40 nM. Se observó la asociación y la disociación de SR344 en base a tiempo real para los clones con unión dependiente del pH. Todas las medidas se llevaron a cabo a 37°C. Se calcularon las constantes de tasa de asociación k_a (1/Ms) y las constantes de tasa de disociación k_d (1/s) usando Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare), y las constantes de disociación KD (M) se calcularon en base a esos valores (Tabla 7).

[Tabla 7] Comparación de Constantes de Tasa de Disociación de Clones de Unión Dependiente del pH de Receptor Soluble de IL-6, SR344

Muestra	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	KD (M)
WT	4,0E+05	1,1E-03	2,7E-09
H3pl/L73	4,1E+05	5,9E-04	1,4E-09
Fv2-IgG1	3,9E+05	7,7E-04	2,0E-09
Fv4-IgG1	7,2E+05	1,0E-03	1,4E-09

Como resultado del cálculo de afinidad a pH 7,4 para cada clon, las constantes de disociación (afinidad, valor KD) de WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1, y Fv4-IgG1 hacia SR344 fueron casi las mismas a 2,7 nM; 1,4 nM; 2,0 nM y 1,4 nM. Se demostró que Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1 tienen una habilidad de unión al receptor soluble de IL-6 igual o mayor que la de WT.

Análisis de Unión de Clones de Unión Dependiente del pH a Receptor de IL-6 de tipo de membrana

Se observaron reacciones antígeno-anticuerpo para receptor de IL-6 de tipo de membrana a pH 5,8 y pH 7,4 para los cuatro tipos de clones construidos WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1, y Fv4-IgG1 mediante el uso de Biacore T100 (GE Healthcare). Se evaluó la unión al receptor de IL-6 de tipo de membrana mediante la evaluación de la unión al receptor de IL-6 inmovilizado sobre un chip sensor. Se biotiniló SR344 de acuerdo con un método conocido por los expertos en la materia, y se inmovilizó el SR344 biotinilado sobre el sensor chip mediante estreptavidina usando la afinidad entre estreptavidina y biotina. Todas las medidas se llevaron a cabo a 37°C. El amortiguador de fase móvil fue MES 10 mM (pH 5,8), NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,05%. Se

inyectaron los clones de unión dependiente del pH bajo condiciones de pH 7,4 para permitir que se unan a SR344 (amortiguador de muestra para inyección: MES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05%), luego, se observó la disociación dependiente del pH de cada clon al pH de la fase móvil de 5,8 (FIG. 17).

Las concentraciones de las muestras se ajustaron a 0,25 µg/ml. La unión se llevó a cabo en MES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, y Tween 20 al 0,05%. La disociación se llevó a cabo en MES 10 mM (pH 5,8), NaCl 150 mM, y Tween 20 al 0,05%. Para este caso, se calcularon las constantes de tasa de disociación ($k_d(1/s)$) a pH 5,8 ajustando solo la fase de disociación a pH 5,8 usando Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare). De forma similar, se ajustaron las concentraciones de muestra a 0,25 µg/ml, se llevó a cabo la unión en MES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, y Tween 20 al 0,05%, la disociación se llevó a cabo en MES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, y Tween 20 al 0,05%, y las constantes de tasa de disociación ($k_d(1/s)$) a pH 7,4 se calcularon ajustando solo la fase de disociación a pH 7,4 usando Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare). Las constantes de tasa de disociación dependiente del pH de cada clon se muestran en la Tabla 8.

[Tabla 8] Comparación de Constantes de Tasa de Disociación de Clones de Unión Dependiente del pH de Receptor de IL-6 de tipo de membrana, SR344

Muestra	$K_d(1/s)$ a pH 7,4	$K_d(1/s)$ a pH 5,8	Dependencia del pH $K_d(pH\ 5,8)/k_d(pH\ 7,4)$
WT	2,5E-04	2,5E-04	1,00
H3pl/L73	2,6E-04	6,7E-04	5,59
Fv2-IgG1	3,4E-04	2,4E-03	7,18
Fv4-IgG1	4,7E-04	2,6E-03	5,56

Como resultado del cálculo de la dependencia del pH para cada clon, las dependencias del pH de la unión al receptor de IL-6 de tipo de membrana de los cuatro clones, WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1, y Fv4-IgG1 con respecto a SR344, fueron 1,0 vez, 2,59 veces, 7,18 veces, y 5,56 veces, respectivamente. Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1 demostraron mayor dependencia del pH en la disociación del receptor de IL-6 de tipo de membrana que H3pl/L73-IgG1.

En base a lo anterior, se demostró que Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1 tienen una unión dependiente del pH más fuerte al receptor de IL-6 de tipo de membrana que H3pl/L73-IgG1 mientras que se mantiene una afinidad hacia el receptor soluble de IL-6 igual a mayor a la de WT.

EJEMPLO 11: Ensayo PK/PD de Anticuerpos de unión dependiente del pH con Regiones Variables Optimizadas Usando Ratones Transgénicos para Receptor de IL-6 humano

Se evaluó la farmacocinética de Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1, así como también de WT y H3pl/L73-IgG1 preparados y evaluados en el Ejemplo 10 usando los ratones transgénicos para receptores de IL-6 humano que se usaron en el Ejemplo 8. Se administraron WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1, o Fv4-IgG1 mediante administración intravenosa en una sola dosis a ratones hIL-6R tg a 25 mg/kg, y se midió la concentración de cada anticuerpo en el plasma de la misma manera que en el Ejemplo 8. Los cursos temporales de las concentraciones en plasma de WT, H3pl/L73-IgG1, Fv2-IgG1, y Fv4-IgG1 se muestran en la FIG. 18

La farmacocinética de H3pl/L73-IgG1 mejoró en comparación con WT de la misma manera que en el Ejemplo 8, mientras que la farmacocinética de Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1 mejoró más que H3pl/L73-IgG1. Las medidas, como las de las concentraciones de receptor de IL-6 no unido medidas en monos macacos en el Ejemplo 9, se llevaron a cabo en los ratones hIL-6R tg en este ensayo usando el mismo método, en donde se confirmó la prolongación de la duración de la neutralización del receptor soluble de IL-6 para Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1 en comparación con la de H3pl/L73-IgG1 (datos no mostrados). Como se indica en el Ejemplo 10, se mejoró la unión dependiente del pH al receptor de IL-6 de tipo de membrana para Fv2-IgG1 y Fv4-IgG1 en comparación con H3pl/L73-IgG1; por lo tanto, se concluyó que es posible una mejora adicional en la farmacocinética y en la duración de la neutralización del receptor soluble de IL-6 por sobre la de H3pl/L73-IgG1 mediante la mejora de la unión dependiente del pH al receptor de IL-6 de tipo de membrana.

EJEMPLO 12: Mejora de la Unión Dependiente del pH al Receptor de IL-6 de tipo de membrana mediante Optimización de la Región Constante

Optimización de la Región Constante de Fv4-IgG1

Por lo general, se ha informado que la unión a antígenos unidos a membrana varía dependiendo de la región constante del anticuerpo (J. Immunol. Methods 1997 Jun 23; 205(1): 67-72). Las regiones constantes de los anticuerpos de unión dependiente del pH que se prepararon previamente fueron del isotipo IgG1. Por lo tanto, se hizo un estudio para la optimización de la región constante con el objetivo de mejorar la unión dependiente del pH al receptor de IL-6 de tipo de membrana.

Se introdujo una mutación en una región constante de origen natural, la región constante IgG2 (SEQ ID N° 28), para construir la región constante IgG2ΔGK (SEQ ID N° 29). Se introdujo otra mutación en la región constante IgG2ΔGK para construir la región constante M58 (SEQ ID N° 30). Se introdujeron otras mutaciones en las regiones constantes IgG2 y M58 para construir las regiones constantes M71 (SEQ ID N° 31) y M73 (SEQ ID N° 32).

Se construyó VH3-IgG2ΔGK (SEQ ID N° 33) mediante la sustitución de la región constante de VH3-IgG1 que se preparó en el Ejemplo 10 por IgG2ΔGK, se construyó VH3-M58 (SEQ ID N° 34) mediante la sustitución de la región constante por M58, y se construyó VH3-M73 (SEQ ID N° 35) mediante la sustitución de la región constante por M73. Más específicamente, se construyó un vector de expresión en el que se sustituyó la porción de región constante de VH3 que se usó en el Ejemplo 10 por una región constante deseada mediante digestión con NheI/NotI y ligación. Las secuencias nucleotídicas de los vectores de expresión resultantes se determinaron usando un método conocido por los expertos en la materia.

La expresión y purificación se llevaron a cabo sobre Fv4-IgG2 usando VH3-IgG2ΔGK (SEQ ID N° 33) para la cadena H y VL3-CK (SEQ ID N° 27) para la cadena L, sobre Fv4-M58 usando VH3-M58 (SEQ ID N° 34) para la cadena H y VL3-CK (SEQ ID N° 27) para la cadena L, y sobre Fv4-M73 usando VH3-M73 (SEQ ID N° 35) para la cadena H y VL3-CK (SEQ ID N° 27) para la cadena L. La expresión y purificación se llevaron a cabo usando el método que se describe en el Ejemplo 1.

Análisis de Unión de Fv4 con Región Constante Optimizada al Receptor Soluble de IL-6

Se observaron la asociación y la disociación de SR344 en base a tiempo real usando el mismo método del Ejemplo 10 para preparar de ese modo Fv4-IgG1,

Fv4-IgG2, Fv4-M58, y Fv4-M73 junto con WT. Se calcularon las constantes de tasa de asociación k_a (1/Ms) y contantes de tasa de disociación k_d (1/s) luego de hacer un análisis del mismo modo, y luego, se calcularon las constantes de disociación KD (M) en base a esos valores (Tabla 9).

[Tabla 9] Comparación de Constantes de Tasa de Disociación de Clones con Unión Dependiente del pH desde Receptor soluble de IL-6, SR344

Muestra	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	KD (M)
Fv4-IgG1	7,2E+05	1,0E-03	1,4E-09
Fv4-IgG2	9,6E+05	1,2E-03	1,3E-09
Fv4-M58	8,3E+05	1,1E-03	1,4E-09
Fv4-M73	7,5E+05	1,9E-03	1,4E-09

Como resultado del cálculo de afinidad a pH 7,4 para cada clon, las constantes de disociación (afinidad, valor KD) de Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58, y Fv4-M73 hacia SR344 fueron casi las mismas a 1,4 nM, 1,3 nM, 1,4 nM, y 1,4 nM, respectivamente. Esto indica que la habilidad de unión de los clones de unión dependiente del pH al receptor soluble de IL-6, SR344, no cambia aun luego de la modificación de la región constante. En base a este hallazgo, se ve que la habilidad de unión al receptor soluble de IL-6 no cambia para Fv1, Fv2, y Fv3 incluso si se modifica en forma similar la región constante.

Análisis de Unión de Fv4 con Región Constante Optimizada al Receptor de IL-6 de tipo de membrana

Se observaron las reacciones antígeno-anticuerpo con receptor de IL-6 de tipo de membrana a pH 5,8 y pH 7,4 para Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58, y Fv4-M73 preparados junto con WT de la misma manera que en el Ejemplo 10, usando Biacore T100 (GE Healthcare). Los resultados obtenidos mediante la inyección de los clones de unión dependiente del pH bajo condiciones de pH 7,4 para la unión con SR344 y mediante la observación de la disociación dependiente del pH de cada clon en una fase móvil a pH 5,8, se muestran en la FIG. 19. Se llevaron a cabo análisis adicionales de la misma manera que en el Ejemplo 10, y las tasas de disociación dependiente del pH para cada clon se muestran en la Tabla 10.

[Tabla 10] Comparación de Constantes de Tasa de Disociación de Clones con Unión Dependiente del pH desde Receptor de IL-6 de tipo de membrana, SR344

Muestra	K_d (1/s) a pH 7,4	K_d (1/s) a pH 5,8	Dependencia del Ph $K_d(\text{pH } 5,8)/k_d(\text{pH } 7,4)$
Fv4-IgG1	4,7E-04	2,6E-03	5,56
Fv4-IgG2	1,0E-03	1,8E-02	16,99
Fv4-M58	5,4E-04	9,5E-03	17,64
Fv4-M73	5,1E-04	5,1E-03	10,06

Como resultado del cálculo de la dependencia del pH para cada clon, las dependencias del pH de Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58, y Fv4-M73 hacia SR344 fueron 5,6 veces, 17,0 veces, 17,6 veces, y 10,1 veces, respectivamente; por consiguiente, Fv4-IgG2, Fv4-M58, y Fv4-M73 demostraron todos una mayor disociación dependiente del pH desde el receptor de IL-6 de tipo de membrana en comparación con Fv4-IgG1.

En base a los resultados del análisis de la unión al receptor soluble de IL-6 y de la unión al receptor de IL-6 de tipo de membrana usando la región variable de Fv4, se encontró que la sustitución de la región constante de IgG1 por IgG2, M58, o M73 pudo mejorar la unión dependiente del pH al receptor de IL-6 de tipo de membrana, sin causar un cambio en la afinidad al receptor soluble de IL-6. Esto se consideró como mantenido en forma similar para Fv1, Fv2, y Fv3.

EJEMPLO 13: Ensayo PK/PD de Anticuerpos de Unión Dependiente del pH con Región Constante Optimizada Usando Ratones Transgénicos para Receptor de IL-6 humano

Se evaluó la farmacocinética de Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, y Fv4-M58 que se prepararon en el Ejemplo 13 usando los ratones transgénicos para receptores de IL-6 humano (ratones hIL-6R tg) que se usaron en el Ejemplo 8 para examinar los efectos de la región constante sobre la farmacocinética. Se administraron WT, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, o Fv4-M58 a los ratones hIL-6R tg mediante administración intravenosa en una sola dosis a 25 mg/kg, y luego, se llevaron a cabo medidas de las concentraciones plasmáticas de cada anticuerpo, de la misma manera que en el Ejemplo 8. Los cursos temporales de las concentraciones en plasma de WT, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, y Fv4-M58 se muestran en la FIG. 20.

Similarmente al Ejemplo 11, la farmacocinética de Fv4-IgG1 mejoró en comparación con WT, y la farmacocinética de Fv4-IgG2 y Fv4-M58 mejoró además en comparación con Fv4-IgG1. Se llevó a cabo una medida como para las concentraciones de receptor de IL-6 sin unir, medidas en monos macacos en el Ejemplo 9, en los ratones hIL-6R tg de este ensayo usando el mismo método, en donde se confirmó la prolongación de la duración de la neutralización del receptor soluble de IL-6 para Fv4-IgG2 y Fv4-M58 en comparación con la de Fv4-IgG1 (datos no mostrados). Como se indica en el Ejemplo 10, la unión dependiente del pH al receptor de IL-6 de tipo de membrana se mejoró para Fv4-IgG2 y Fv4-M58 en comparación con Fv4-IgG1; Por lo tanto, se demostró que la mejora en la unión dependiente del pH al receptor de IL-6 de tipo de membrana y por consiguiente la mejora en la farmacocinética y duración de la neutralización del receptor soluble de IL-6 son posibles mediante la sustitución de la región constante de IgG1 a IgG2 o M58. En base a este hallazgo, se espera que la farmacocinética y la duración de la neutralización del receptor soluble de IL-6, no solo en el caso de Fv4, sino también en los casos de Fv1, Fv2, y Fv3, mejore en una mayor extensión que en el caso de IgG1 mediante la sustitución de la región constante de IgG1 a IgG2 o M58.

EJEMPLO 14: Construcción de Anticuerpos de Unión Dependiente del pH con Regiones Variables y Constantes Optimizadas

Se construyeron VH2-M71 (SEQ ID N° 36) y VH2-M73 (SEQ ID N° 37), con M71 y M73 para la región constante de VH2-IgG1, y VH4-M71 (SEQ ID N° 38) y VH4-M73 (SEQ ID N° 39), con M71 y M73 para la región constante de VH4-IgG1, usando el mismo método que se describió previamente.

Se expresaron y purificaron Fv1-M71 usando VH2-M71 para la cadena H y VL2-CK para la cadena L, Fv1-M73 usando VH2-M73 para la cadena H y VL2-CK para la cadena H, Fv3-M71 usando VH4-M71 para la cadena H y VL1-CK para la cadena L, y Fv3-M73 usando VH4-M73 para la cadena H y VL1-CK para la cadena L. La expresión y purificación se llevaron a cabo usando el método que se describe en el Ejemplo 1.

Análisis de la Unión de Anticuerpos de Unión Dependiente del pH, con Regiones Variables y Constantes Optimizadas, a Receptor Soluble de IL-6

Se observó la asociación y la disociación de SR344 en base a tiempo real usando el mismo método del Ejemplo 10 para los once tipos de anticuerpos, anticuerpo PM1 humanizado (de tipo salvaje: WT) y H3pl/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M71, Fv3-M73, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58, y Fv4-M73, construidos previamente. Se calcularon las constantes de tasa de asociación k_a (1/Ms) y contantes de tasa de disociación k_d (1/s) mediante un análisis hecho de la misma manera, y las constantes de disociación KD (M) se calcularon en base a esos valores (Tabla 11).

[Tabla 11] Comparación de Constantes de Tasa de Disociación de Clones con Unión Dependiente del pH de Receptor soluble de IL-6, SR344

Muestra	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	KD (M)
WT	4,0E+05	1,1E-03	2,7E-09
H3pl/L73	4,1E+05	5,9E-04	1,4E-09
Fv1-M71	5,5E+05	5,4E-04	9,7E-10
Fv1-M73	6,1E+05	5,5E-04	9,1E-10
Fv2-IgG1	3,9E+05	7,7E-04	2,0E-09
Fv3-M71	7,8E+05	8,2E-04	1,1E-09
Fv3-M73	8,5E+05	8,7E-04	1,0E-09
Fv4-IgG1	7,2E+05	1,0E-03	1,4E-09
Fv4-IgG2	9,6E+05	1,2E-03	1,3E-09
Fv4-M58	8,3E+05	1,1E-03	1,4E-09
Fv4-M73	7,5E+05	1,0E-03	1,4E-09

Los diez tipos de clones de unión dependiente del pH se encontraron con constantes de disociación (afinidad, valor KDs) de receptor soluble de IL-6 igual o mayor que para WT.

Análisis de la Unión de Anticuerpos de Unión Dependiente del pH, con Regiones Variables y Constantes Optimizadas, a Receptor de IL-6 de tipo de membrana

Se observaron reacciones antígeno-anticuerpo hacia receptor de IL-6 de tipo de membrana a pH 5,8 y pH 7,4 de la misma manera que en el Ejemplo 10, usando Biacore T100 (GE Healthcare) para los once tipos de anticuerpos, anticuerpo PM1 humanizado (de tipo salvaje: WT) y H3pl/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M71, Fv3-M73, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58, y Fv4-M73, preparados previamente. Se

inyectaron los clones con unión dependiente del pH bajo la condición de pH 7,4 para permitir que se unan a SR344, y luego, se observó la disociación dependiente del pH de cada clon al pH de la fase móvil, pH 5,8. Los resultados se muestran en la FIG. 21 (los resultados para Fv1-M71, Fv1-M73, Fv3-M71, y Fv3-M73 se muestran en la FIG. 21, mientras que los resultados para los otros clones se muestran en las FIGs. 17 y 19). Los análisis se llevaron a cabo de la misma manera que en el Ejemplo 10 y las dependencias del pH para las constantes de tasa de disociación de los once tipos de clones se muestran en la Tabla 12.

[Tabla 12] Dependencias del pH de las Constantes de Tasa de Disociación de Clones con Unión Dependiente del pH de Receptor de IL-6 de tipo de membrana, SR344

Muestra	K _d (1/s) a pH 7,4	K _d (1/s) a pH 5,8	Dependencia del pHkd (pH 5,8)/kd (pH 7,4)
WT	2,5E-04	2,5E-04	1,00
H3pl/L73	2,6E-04	6,7E-04	2,59
Fv1-M71	6,1E-04	6,9E-03	11,29
Fv1-M73	3,7E-04	3,2E-03	8,80
Fv2-IgG1	3,4E-04	2,4E-03	7,18
Fv3-M71	9,1E-04	9,7E-03	10,74
Fv3-M73	4,9E-04	5,3E-03	10,88
Fv4-IgG1	4,7E-04	2,6E-03	5,56
Fv4-IgG2	1,0E-03	1,8E-02	16,99
Fv4-M58	5,4E-04	9,5E-03	17,64
Fv4-M73	5,1E-04	5,1E-03	10,06

Los diez tipos de clones con unión dependiente del pH que se obtuvieron demostraron una habilidad de unión dependiente del pH hacia el receptor de IL-6 de tipo de membrana. Más aun, se encontró que todos de Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M71, Fv3-M73, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58, y Fv4-M73 demostraron una mejor unión dependiente del pH hacia el receptor de IL-6 de tipo de membrana, en comparación con H3pl/L73-IgG1, para el que se encontró que el tiempo hasta que el anticuerpo desaparece del plasma así como también el tiempo en el cual el receptor soluble de IL-6 y el receptor de IL-6 de tipo de membrana están unidos por los

anticuerpos en el cuerpo, son considerablemente más prolongados en comparación con WT en monos macacos, en el Ejemplo 9.

EJEMPLO 15: Ensayo PK/PD de Anticuerpos de Unión Dependiente del pH con Regiones Variables y Constantes Optimizadas Usando Monos macacos
Construcción de Anticuerpo anti-receptor de IL-6 de Alta Afinidad Conocida

Se construyó un vector de expresión en células de mamífero para que exprese el anticuerpo de alta afinidad anti-receptor de IL-6 VQ8F11-21 hIgG1 que se describe en US 2007/0280945 A1 (US 2007/0280945 A1, secuencias de aminoácidos 19 y 27), como anticuerpo de alta afinidad anti-receptor de IL-6. Se construyó una región variable de anticuerpo mediante PCR combinando oligo ADN sintético (PCR por ensamblaje). Se amplificó la región constante por PCR a partir del vector de expresión que se usó en el Ejemplo 1. Se ligaron la región variable de anticuerpo y la región constante de anticuerpo mediante PCR de ensamblaje y se insertaron en un vector para expresión en mamíferos. Se insertaron los fragmentos de ADN resultantes de cadena H y cadena L en el vector de expresión en células de mamíferos para construir el vector de expresión de cadena H y el vector de expresión de cadena y L buscados. Se determinó la secuencia de nucleótidos de los vectores de expresión resultantes mediante un método conocido por los expertos en la materia. Se llevó a cabo la expresión y purificación usando los vectores de expresión contruidos. La expresión y purificación se llevaron a cabo usando el método que se describe en el Ejemplo 1 para obtener anticuerpo de alta afinidad anti-receptor de IL-6 (Ab de alta afinidad).

Ensayo PK/PD en Monos macacos

Se evaluaron la farmacocinética y la eficacia farmacológica en monos macacos para los anticuerpos de unión dependiente del pH H3pl/L73-IgG1 y Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73, y Fv4-M73 y para el anticuerpo de conocida alta afinidad anti-receptor de IL-6 (Ab de alta afinidad). Se administró H3pl/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73, o Fv4-M73 a monos macacos mediante administración intravenosa en una sola dosis a 0,5 mg/kg, mientras que se administró el Ab de alta afinidad mediante administración intravenosa en una sola dosis a 1,0 mg/kg. Se colectaron muestras de sangre antes de la administración y a lo largo del tiempo. Se midió la concentración en plasma de cada anticuerpo de la misma manera que en el

Ejemplo 9. Los cursos temporales de las concentraciones en plasma de H3pl/L73-IgG1, Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73, y Fv4-M73, así como también para el Ab de alta afinidad se muestran en la FIG. 21. Con el objetivo de evaluar la eficacia farmacológica en términos del grado en el cual se neutraliza el receptor de IL-6 de tipo de membrana de mono macaco, se administró IL-6 de mono macaco por vía subcutánea en el dorso inferior de los animales diariamente a 5 µg/kg entre el día 3 y el día 10 luego de la administración del anticuerpo (entre el día 6 y el día 10 con respecto al Ab de alta afinidad) de la misma manera que en el Ejemplo 9. Se midió la concentración de CRP de cada animal 24 horas luego de cada administración. Los cursos temporales de las concentraciones de CRP durante la administración de cada anticuerpo se muestran en la FIG. 22. Con el objetivo de evaluar la eficacia farmacológica en términos del grado de neutralización del receptor soluble de IL-6 de mono macaco, se midió la concentración de receptor soluble de IL-6 sin unir de mono macaco en plasma de monos macacos de la misma forma que en el Ejemplo 9. Los cursos temporales de las concentraciones de receptor soluble de IL-6 sin unir de mono macaco durante la administración de cada anticuerpo se muestran en la FIG. 23

Como resultado, las concentraciones de anticuerpo se mantuvieron altas en el plasma para cada uno de Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M73 y Fv4-M73 en comparación con H3pl/L73-IgG1, mientras que las concentraciones de CRP y del receptor soluble de IL-6 de mono macaco no unido se mantuvieron a niveles bajos. O sea que, este resultado demostró que el tiempo durante el cual el receptor de IL-6 de tipo de membrana y el soluble están unidos al anticuerpo (o en otras palabras, la duración de la neutralización) fue prolongada para estos anticuerpos en comparación con H3pl/L73-IgG1.

Además, para los anticuerpos anti-receptor de IL-6 con unión dependiente del pH, se confirmaron los efectos de neutralización y la eficacia sostenida igual o mayor que la del anticuerpo de alta afinidad conocida anti-receptor de IL-6 (Ab de alta afinidad) administrado a 1,0 mg/kg, a solo la mitad de esa dosificación, o sea 0,5 mg/kg. Por lo tanto, se descubrió que los anticuerpos de unión dependiente del pH tienen efectos de neutralización y eficacia sostenida superior a la del anticuerpo de alta afinidad conocida anti-receptor de IL-6.

Aquellos anticuerpos que se muestran en la Tabla 12 para los que no se llevaron a cabo los ensayos PK/PD usando monos macacos como en este ensayo, también se confirmaron para demostrar una mejor unión dependiente del pH al receptor de IL-6 de tipo de membrana en comparación con H3pl/L73-IgG1; por lo tanto, también se espera que el tiempo durante el cual los receptores de tipo de membrana y los receptores solubles de IL-6 estén unidos al anticuerpo (o en otras palabras, la duración de la neutralización y los efectos de neutralización sostenida) sea más prolongado para estos anticuerpos en comparación con H3pl/L73-IgG1.

En el Ejemplo 9, se halló que el tiempo hasta que desaparece el anticuerpo del plasma así como también el tiempo en el cual el receptor soluble de IL-6 y receptor de IL-6 de tipo de membrana están unidos al anticuerpo en el cuerpo (efectos de neutralización sostenida) es considerablemente prolongado para H3pl/L73-IgG1 en comparación con WT. Fv1-M71, Fv1-M73, Fv2-IgG1, Fv3-M71, Fv3-M73, Fv4-IgG1, Fv4-IgG2, Fv4-M58, y Fv4-M73, con efectos de neutralización sostenida superiores a H3pl/L73-IgG1, se espera por lo tanto que tengan efectos de neutralización sostenida remarcablemente mejores en comparación con WT.

En contraste con los anticuerpos anti-receptor de IL-6, los anticuerpos anti-receptor de IL-6 de unión dependiente del pH, que se hacen para unirse fuertemente al antígeno al pH del plasma de pH 7,4, pero para unirse solo débilmente al antígeno al pH de los endosomas de pH 5,8, hacen posible reducir la dosificación al paciente y la frecuencia de administración del anticuerpo anti-receptor de IL-6, y como resultado de lo mismo, pueden reducir considerablemente la cantidad de anticuerpo administrado total; por lo tanto, se espera que los anticuerpos anti-receptor de IL-6 de unión dependiente del pH sean extremadamente superiores como compuestos farmacéuticos para usar como antagonista de IL-6.

EJEMPLO 16: Construcción de Anticuerpo Anti-IL-6 de Unión Dependiente del pH

Expresión y Purificación de Anticuerpo Anti-IL-6

En los Ejemplos 1 a 15, se crearon exitosamente una pluralidad de anticuerpos anti-receptor de IL-6 humanizados, que se unen en forma dependiente del pH al receptor de IL-6, impartiendo la dependencia a través de la introducción de sustituciones de

histidina y similares en la región variable, en particular, en la secuencia CDR de los anticuerpos anti-receptor de IL-6 humanizados. Se halló que todos estos anticuerpos se unen repetidamente al receptor de IL-6 y demuestran una mejora considerable en PK/PD.

Por lo tanto, se confirmó que se puede conferir la habilidad dependiente del pH de un anticuerpo para unir a un antígeno a otro anticuerpo que une a un antígeno distinto al receptor de IL-6, usando un método similar. Se eligió como antígeno a la IL-6 humana, y se construyó un anticuerpo anti-IL-6 incluyendo la cadena H (WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 62) y cadena L (WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 63), que se une a IL-6 como se describe en WO 2004/039826, ("Anti-IL6 de tipo salvaje"). Usando un método conocido por los expertos en la materia, se insertaron fragmentos de genes que codifican para las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos de interés en el vector de expresión en células de mamíferos para construir el vector de expresión de cadena H y el vector de expresión de cadena y L de interés. Se determinó la secuencia de nucleótidos de los vectores de expresión resultantes usando un método conocido por los expertos en la materia. Se expresó y purificó anti-IL6 de tipo salvaje mediante el método que se describe en el Ejemplo 1.

Construcción de Anticuerpo Anti-IL-6 Dependiente del pH

Para conferir al anticuerpo la habilidad dependiente del pH para unirse a IL-6, se introdujeron sustituciones de histidina en los aminoácidos de la CDR del anticuerpo anti-IL6 (Anti-IL6 de tipo salvaje) incluyendo la cadena H (WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 62) y la cadena L (WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 63). Mediante la sustitución de histidina en los aminoácidos de la CDR y mediante el subsiguiente cribado, se obtuvieron varios clones que demostraron una unión dependiente del pH. La unión a pH 5,5 se redujo significativamente en comparación con la unión a pH 7,4. Las posiciones de las sustituciones de histidina en los clones dependientes del pH se muestran en la Tabla 13. Los ejemplos incluyen al "Clon Anti-IL6 1" incluyendo la cadena H (c1) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 64) y la cadena L (c1) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 65), y al "Clon Anti-IL6 2" incluyendo la cadena H (c1) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 64) y la cadena L (c2) (secuencia

de aminoácidos: SEQ ID N° 66). Los clones Anti-IL6 1 y Anti-IL6 2 se expresaron y purificaron mediante el método que se describe en el Ejemplo 1.

[Tabla 13] Posiciones de Sustitución de Histidina en los clones dependientes del pH

H32, H59, H61, H99
L53, L54, L90, L94

Análisis de Unión de clones dependientes del pH a IL-6 humana

Se llevó a cabo un análisis cinético de las reacciones antígeno-anticuerpo a pH 5,5 y pH 7,4 usando Biacore T100 (GE Healthcare) para los tres tipos de anticuerpo preparados según se mencionó previamente: Anti-IL6 de tipo salvaje, Clon Anti-IL6 1, y Clon Anti-IL6 2 (amortiguador: DPBS(-) (pH 7,4 o pH 5,5), NaCl 150 mM). Se unieron los anticuerpos a un chip sensor sobre el que se inmovilizó proteína A/G recombinante (Pierce) mediante acoplamiento con aminas, y luego se inyectó IL-6 humana (Toray) ajustada a una concentración apropiada sobre el chip, como analito. Todas las medidas se llevaron a cabo a 37°C. Se calcularon las constantes de tasa de asociación (1/Ms) y las contantes de tasa de disociación kd (1/s) usando Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare), y se calcularon las constantes de disociación KD (M) en base a esos valores (Tabla 14). Además se calculó la proporción de afinidad a pH 5,5 y pH 7,4 para cada clon para evaluar la unión dependiente del pH.

[Tabla 14] Comparación de unión de clones dependientes del pH a IL-6

Muestra	pH	K _a (1/M _s)	K _d (1/s)	KD (M)	KD (Ph 5,5)/(KD pH 7,4)
Tipo salvaje	pH 7,4	2,05E+07	3,91E-04	1,91E-11	0,8
	pH 5,5	1,52E+07	2,45E-04	1,61E-11	
Clon 1	pH 7,4	1,07E+07	4,71E-03	4,38E-10	10,3
	pH 5,5	2,05E+06	9,26E-03	4,52E-09	
Clon 2	pH 7,4	8,96E+06	2,63E-03	2,94E-10	13,5
	pH 5,5	2,76E+06	1,10E-02	3,98E-09	

La proporción de afinidad a pH 5,5 y pH 7,4 ((KD)(pH 5,5)/(KD)(pH 7,4)) calculada, la que indica la unión dependiente del pH a IL-6 humana, fue de 0,8; 10,3; y 13,5 para

Anti-IL6 de tipo salvaje, Clon Anti-IL6 1, y Clon Anti-IL6 2, respectivamente. O sea, la habilidad de unión dependiente del pH de cada clon es 10 veces más grande que la de WT. Los sensogramas del Clon Anti-IL6 2 a pH 7,4 y pH 5,5 se muestran en la FIG. 26.

Por consiguiente, se demostró que, como en el caso de los anticuerpos anti-receptor de IL-6, se pueden construir anticuerpos anti-IL-6 de unión dependiente del pH que se unen fuertemente al antígeno bajo las condiciones neutras del plasma, pero débilmente bajo las condiciones ácidas del endosoma, mediante la introducción de sustituciones de histidina y similares principalmente en las secuencias de aminoácidos de la CDR. Como se indica en los ejemplos 1 a 15, un anticuerpo anti-receptor de IL-6 que tiene una habilidad de unión dependiente del pH se une repetidamente al receptor de IL-6 y se mejora notablemente la proporción PK/PD. O sea, se espera que el Clon Anti-IL6 1 y el Clon Anti-IL6 2, que tienen una habilidad de unión dependiente del pH, se unan repetidamente a más antígenos con una significativamente mejor PK/PD, en comparación con el Anti-IL6 de tipo salvaje.

EJEMPLO 17: Construcción de Anticuerpo Anti-Receptor de IL-31 con Unión Dependiente del pH

Expresión y Purificación de Anticuerpo Anti-Receptor de IL-31

En los ejemplos 1 a 15, se crearon con éxito una pluralidad de anticuerpos anti-receptor de IL-6 humanizados que se unen en forma dependiente del pH al receptor de IL-6 confiriendo esta dependencia a través de la introducción de sustituciones de histidina y similares en la región variable, en particular, en la secuencia CDR de los anticuerpos anti-receptor de IL-6 humanizados. Se halló que todos estos anticuerpos se unen repetidamente al receptor de IL-6 y que demuestran una considerable mejora de PK/PD.

Por lo tanto, se confirmó que se puede conferir la habilidad dependiente del pH de un anticuerpo que se une a un antígeno a otro anticuerpo que se une a un antígeno distinto al receptor de IL-6 usando un método similar. Se eligió como antígeno al receptor de IL-31 de ratón, y se construyó un anticuerpo anti-receptor de IL-31 incluyendo la cadena H (WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 67) y la cadena L (WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 68), que se une al receptor de IL-31 de ratón como se describe en WO 2007/142325, ("Anti-IL31R de tipo salvaje"). Usando un

método conocido por los expertos en la materia, se insertaron fragmentos de genes que codifican para las secuencias de aminoácidos de interés en un vector de expresión en células de mamíferos para construir el vector de expresión de cadena H y el vector de expresión de cadena L de interés. Se determinó la secuencia de nucleótidos de los vectores de expresión resultantes usando un método conocido por los expertos en la materia. Se expresó y purificó anti-IL31R de tipo salvaje mediante el método que se describe en el Ejemplo 1.

Construcción de Anticuerpo Anti-Receptor de IL-31 Dependiente del pH

Para conferir al anticuerpo la habilidad dependiente del pH para unirse al receptor de IL-31, se introdujeron sustituciones de histidina en los aminoácidos de la CDR del anticuerpo anti-receptor de IL-31 (Anti-IL31R de tipo salvaje) incluyendo la cadena H (WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 67) y la cadena L (WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 68). Mediante las sustituciones de histidina en los aminoácidos de la CDR y el subsiguiente cribado, se obtuvieron varios clones que demostraron una unión dependiente del pH. La unión a pH 5,5 se redujo significativamente en comparación con la unión a pH 7,4. La posición de las sustituciones de histidina en los clones dependientes del pH se muestra en la Tabla 15. Un ejemplo es el "clon Anti-IL31R 1" incluyendo la cadena H (c1) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 69) y la cadena L (WT). El clon Anti-IL31R 1 se expresó y purificó usando el método que se describe en el Ejemplo 1.

[Tabla 15] Posición de Sustitución de Histidina en los clones dependientes del pH

H33

Análisis de Unión de Clones Dependientes del pH a Receptor Soluble de IL-31

El análisis cinético de las reacciones antígeno-anticuerpo a pH 5,5 y pH 7,4 se llevó a cabo usando Biacore T100 (GE Healthcare) para los dos tipos de anticuerpos preparados como se mencionó previamente: Anti-IL31R de tipo salvaje y clon Anti-IL31R 1 (amortiguador: DPBS(-) (pH 7,4 o pH 5,5), NaCl 150 mM, Tween 20 de 0,01%, NaN₃ al 0,02%). Se unieron los anticuerpos a un chip sensor sobre el que se inmovilizó proteína A/G recombinante (Pierce) mediante acoplamiento con aminas, y luego se inyectó receptor soluble de IL-31 de ratón (preparado de acuerdo al método que se describe en

WO 2007/142325), ajustado a una concentración apropiada, como analito. Todas las medidas se llevaron a cabo a 25°C. Se calcularon las constantes de tasa de asociación (1/Ms) y las constantes de tasa de disociación kd (1/s) usando Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare), y se calcularon las constantes de disociación KD (M) en base a esos valores (Tabla 16). Además se calculó la proporción de afinidad a pH 5,5 y pH 7,4 para cada clon para evaluar la unión dependiente del pH.

[Tabla 16] Comparación de Unión de Clones Dependientes del pH a Receptor de IL-31 de Ratón

Muestra	pH	K _a (1/Ms)	K _d (1/s)	KD (M)	KD (pH 5,5)/(KD pH 7,4)
Tipo salvaje	pH 7,4	1,40E+05	3,40E-03	2,30E-08	3,2
	pH 5,5	5,10E+05	3,80E-03	7,40E-08	
Clon 1	pH 7,4	1,70E+05	3,30E-03	2,20E-08	1000,0
	pH 5,5	1,10E+03	2,40E-02	2,20E-05	

La proporción de afinidad a pH 5,5 y pH 7,4 ((KD)(pH 5,5)/(KD)(pH 7,4)) calculada, la cual indica una unión dependiente del pH al receptor de IL-31 de ratón, fue de 3,2 y 1000 para el Anti-IL31R de tipo salvaje y para el clon Anti-IL31R 1, respectivamente. O sea, la habilidad de unión dependiente del pH del clon Anti-IL31R 1 es más de 300 veces más grande que la de WT. Los sensogramas para el clon Anti-IL31R 1 a pH 7,4 y pH 5,5 se muestran en la FIG. 27.

Por consiguiente, se demostró que, como en los casos de los anticuerpos anti-receptor de IL-6 y anticuerpos anti-IL-6, se pudieron construir anticuerpos anti-receptor de IL-31 de unión dependiente del pH que se unen al antígeno fuertemente bajo las condiciones neutras del plasma, pero débilmente bajo las condiciones ácidas del endosoma, mediante la introducción de sustituciones de histidina y similares principalmente en las secuencias de aminoácidos de la CDR. Como se indicó en los ejemplos 1 a 15, un anticuerpo anti-receptor de IL-6 que tiene la habilidad de unión dependiente del pH se une repetidamente al receptor de IL-6 y mejora notablemente su PK/PD. O sea, se espera que el clon Anti-IL31R 1, que tiene la habilidad de unión

dependiente del pH, se una repetidamente a más antígenos con una significativamente mejor PK/PD, en comparación con el Anti-IL31R de tipo salvaje.

EJEMPLO 18: Unión Repetitiva a Antígeno mediante Anticuerpo de Unión Dependiente del pH

Expresión y Purificación de Anticuerpo Administrado a Ratones

Se prepararon los cuatro tipos de anticuerpos anti-receptor de IL-6 humanizados que se describen más adelante. Como anticuerpos que no se unen en forma dependiente del pH al receptor de IL-6, se expresaron y purificaron WT-IgG1 incluyendo a H (WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 9) y L (WT) (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 10), y H54/L28-IgG1 incluyendo a H54 (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 70) y L28 (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 12) usando el método que se indica en el Ejemplo 1. Como anticuerpos que se unen en forma dependiente del pH al receptor de IL-6, se expresaron y purificaron H170/L82-IgG1 del Ejemplo 3 incluyendo H170 (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 4) y L82 (secuencia de aminoácidos: SEQ ID N° 7), y Fv4-IgG1 del Ejemplo 10 incluyendo a VH3-IgG1 (SEQ ID N° 23) y VL3-CK (SEQ ID N° 27), usando el método que se indicó en el Ejemplo 1.

Análisis de Unión de Cada Tipo de Anticuerpo al Receptor Soluble de IL-6

Se llevó a cabo un análisis cinético de las reacciones antígeno-anticuerpo a pH 7,4 y pH 5,8 usando Biacore T100 (GE Healthcare) para los cuatro tipos de anticuerpo: WT-IgG1, H54/L28-IgG1, H170/L82-IgG1, y Fv4-IgG1 (amortiguador: MES 10 mM (pH 7,4 o pH 5,8), NaCl 150 mM, Surfactant-P20 al 0,05%). Se unieron los anticuerpos a un chip sensor sobre el que se inmovilizó proteína A/G recombinante (Pierce) mediante acoplamiento con aminas, y se inyectó SR344, ajustado a una concentración apropiada, como analito. Se observó la asociación con y la disociación de SR344 para cada tipo de anticuerpo en base a tiempo real. Todas las medidas se llevaron a cabo a 37°C. Se calcularon las constantes de tasa de asociación (1/Ms) y las constantes de tasa de disociación k_d (1/s) usando Biacore T100 Evaluation Software (GE Healthcare), y se calcularon las constantes de disociación KD (M) en base a esos valores (Tabla 17).

[Tabla 17] Comparación de Tasas de Asociación (k_a), Tasas de Disociación (k_d), y Constantes de Disociación de Cada Tipo de Anticuerpo Contra Receptor soluble de IL-6 (SR344)

Muestra	pH 7,4			pH 5,8			Dependencia del pH	
	ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	kd (pH 5,8)/kd (pH 7,4)	KD (pH 5,8)/KD (pH 7,4)
WT-IgG1	4,9E+5	9,4E-4	1,9E-9	8,9E+5	2,7E-3	3,1E-9	2,9	1,6
H54/L28-IgG1	8,3E+5	1,4E-3	1,7E-9	2,4E+6	2,7E-3	1,1E-9	2,0	0,7
H170/L82-IgG1	6,7E+5	1,1E-3	1,6E-9	1,2E+5	1,3E-2	1,0E-7	11,4	61,9
Fv4-IgG1	9,8E+5	9,5E-4	9,7E-10	1,4E+6	3,7E-2	2,6E-8	38,8	27,3

Se calculó la relación de afinidad (KD) a pH 5,8 y pH 7,4 para cada anticuerpo. La proporción KD, que indica la unión dependiente del pH a SR344, fue de 1,6; 0,7; 61,9; y 27,3 para WT-IgG1, H54/L28-IgG1, H170/L82-IgG1, y Fv4-IgG1, respectivamente. Además, se calculó la proporción de tasa de disociación (k_d) a pH 5,8 y pH 7,4 para cada anticuerpo. La proporción k_d , que indica la tasa de disociación dependiente del pH para SR344, fue de 2,9; 2,0; 11,4 y 38,8 para WT-IgG1, H54/L28-IgG1, H170/L82-IgG1, y Fv4-IgG1, respectivamente. Por consiguiente, se confirmó que H170/L82-IgG1 y Fv4-IgG1 demuestran una unión dependiente del pH, mientras que los anticuerpos convencionales WT-IgG1 y H54/L28-IgG1 exhiben muy poca habilidad. Además, debido a que la afinidad (KD) de estos anticuerpos a pH 7,4 fue casi igual, se espera que la habilidad para unirse a SR344 en el plasma sea equivalente.

Ensayos de Farmacocinética *In Vivo* Usando Ratones

Se evaluó la farmacocinética de SR344 y del anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano luego de una administración de solamente una dosis simple de SR344 (receptor de IL-6 humano: que se preparó en el Ejemplo 1), o bien la administración simultánea de SR344 y el anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano, a ratones que no expresan el receptor de IL-6 humano al que estos anticuerpos se unen (C57BL/6J: estos anticuerpos no se unen al receptor de IL-6 de ratón), o luego de administración conjunta de SR344 y del anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano a los ratones. Se administró una solución de SR344 (5 µg/ml) o una solución con mezcla de SR344 y anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano (5 µg/ml y 0,1 mg/ml, respectivamente) en la vena caudal mediante administración en una dosis a 10 ml/kg. Debido a que el anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano estaba presente en una cantidad en exceso adecuada en relación a SR344, se

esperaba que casi todas las moléculas de SR344 estén unidas al anticuerpo. Se colectaron muestras de sangre a 15 minutos, 2 horas, 8 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 7 días, 14 días, 21 días, y 28 días luego de la administración. Las muestras de sangre colectada se centrifugaron inmediatamente durante 15 minutos a 15.000 rpm y 4°C para obtener el plasma. El plasma separado se almacenó en un congelador a -20°C o menos hasta el momento de la medida. Se usaron los antes descritos WT-IgG1, H54/L28-IgG1, H170/L82-IgG1, y Fv4-IgG1 como anticuerpos anti-receptor de IL-6 humano.

Medida de Concentración Plasmática de Anticuerpo Anti-Receptor de IL-6 humano Mediante ELISA

Se midió la concentración de anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano en plasma de ratón mediante ELISA. Se agregó fragmento anti-IgG humana (específico para cadena γ) F(ab')₂ (Sigma) en una Nunc-ImmunoPlate MaxiSorp (Nalge Nunc International) y se dejó en reposo durante una noche a 4°C para preparar placas con anti-IgG humana inmovilizado. Se prepararon muestras para curva de calibración con plasma a concentraciones de 0,8; 0,4; 0,2, 0,1; 0,05; 0,025 y 0,0125 $\mu\text{g/ml}$, y muestras de plasma de ratón diluidas 100 veces o más. Se agregaron 200 μL de SR344 20 ng/ml a 100 μL de las muestras para curva de calibración y de las muestras de plasma, y luego se dejaron las muestras en reposo durante 1 horas a temperatura ambiente. Subsiguientemente, se dispensaron las muestras en las placas con anti-IgG humana inmovilizada, y se dejó en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se agregó anticuerpo Biotinilado Anti-IL-6R Humano (R&D) para que reaccione durante 1 hora a temperatura ambiente. Subsiguientemente, se agregó Streptavidin-PolyHRP80 (Stereospecific Detection Technologies) para que reaccione durante 1 hora a temperatura ambiente, y se llevó a cabo la reacción cromogénica usando TMP One Component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories) como sustrato. Luego de detener la reacción con ácido sulfúrico 1 N (Showa Chemical), se midió la absorbancia a 450 nm con un lector de microplacas. Se calculó la concentración en plasma de ratón a partir de la absorbancia de la curva de calibración usando el programa analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). El curso temporal de la concentración en plasma

luego de la administración intravenosa medida por este método se muestra en la FIG. 28.

Medida de Concentración Plasmática de SR344 Mediante Electroquimioluminiscencia

Se midió la concentración de SR344 en plasma de ratón mediante electroquimioluminiscencia. Las muestras de SR344 para curva de calibración se ajustaron a concentraciones de 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5 y 31,25 pg/ml, y se prepararon las muestras de plasma de ratón diluidas 50 veces o más. Las muestras se mezclaron con una solución de Anticuerpo Monoclonal Anti-IL-6R Humano (R&D) marcado con rutenio con Sulfo-Tag NHS Ester (Meso Scale Discovery), Anticuerpo Biotinilado Anti-IL-6R Humano (R&D), y WT-IgG1, y luego se dejaron reaccionar durante una noche a 37°C. La concentración final de WT-IgG1 fue de 333 µg/ml, lo que representa un exceso con respecto a la concentración de anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano contenido en las muestras, con el propósito de unir casi todas las moléculas de SR344 en las muestras al WT-IgG1. Subsiguientemente, se dispensaron las muestras en una MA400 PR Streptavidin Plate (Meso Scale Discovery), y se dejaron reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente, y se llevó a cabo un lavado. Inmediatamente después de agregar Read Buffer T (x4) (Meso Scale Discovery), se llevó a cabo la medida con el Sector PR 400 Reader (Meso Scale Discovery). Se calculó la concentración de SR344 en base a la curva de calibración usando el programa analítico SOFTmax PRO (Molecular Devices). El curso temporal de la concentración plasmática de SR344 luego de la administración intravenosa, según la medida con este método, se muestra en la FIG. 29.

Efectos de la unión dependiente del pH

Con respecto al curso temporal de la concentración de anticuerpo de WT-IgG1 y H54/L28-IgG1, los que no demuestran una unión dependiente del pH, y H170/L82-IgG1 y Fv4-IgG1, los que demuestran una unión dependiente del pH, el curso temporal de la concentración fue casi idéntico para WT-IgG1, H54/L28-IgG1 y Fv4-IgG1, mientras que H170/L82-IgG1 se eliminó algo más rápidamente. Los datos de curso temporal para la concentración en plasma se analizaron mediante el programa de análisis de farmacocinética WinNonlin (Pharsight). Las vidas medias en el plasma para WT-IgG1,

H54/L28-IgG1, Fv4-IgG1, y H170/L28-IgG1 fueron 21,0; 28,8; 26,2 y 7,5 días, respectivamente

Como se describió en el Ejemplo 2, cuando el antígeno es un antígeno soluble, el anticuerpo administrado se une al antígeno en el plasma, y queda retenido en el plasma en la forma de un complejo antígeno-anticuerpo. Por lo general, en contraste con un tiempo de retención en plasma extremadamente largo de un anticuerpo (la tasa de eliminación es extremadamente baja) debido a la función del FcRn, el tiempo de retención en plasma de un antígeno es corto (la tasa de eliminación es alta). Por consiguiente, un antígeno que está unido a un anticuerpo tiene una retención en plasma prolongada, similar a la de un anticuerpo (la tasa de eliminación es extremadamente baja). De forma similar, cuando se administró el antígeno del anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado, SR344 (receptor soluble de IL-6), solo, SR344 se eliminó extremadamente rápido (vida media en plasma: 0,2 días). Sin embargo, en el caso de administración conjunta de SR344 con un anticuerpo convencional, WT-IgG1 o H54/L28-IgG1, que no demuestran una unión dependiente del pH, la tasa de eliminación de SR344 se redujo considerablemente, y se prolongó el tiempo de retención en plasma de SR344 (vida media en plasma: 5,3 días para WT-IgG1, 6,3 días para H54/L28-IgG1). Esto es debido a que casi todas las moléculas de SR344 estaban unidas a los anticuerpos que se administraron juntos, y por consiguiente el SR344 unido a los anticuerpos tuvo un tiempo de retención prolongado en plasma similar al del anticuerpo, debido a la función del FcRn, como se describió previamente.

En el caso de la administración concurrente de SR344 con el anticuerpo H170/L82-IgG1 o con Fv4-IgG1, los que demuestran una unión dependiente del pH, la eliminación de SR344 fue significativamente rápida (vida media en plasma: 1,3 días para H170/L82-IgG1, 0,6 días para Fv4-IgG1), en comparación con el caso de la administración concurrente de WT-IgG1 o H54/L28-IgG1. Esta tendencia fue particularmente notable para Fv4-IgG1. Debido a que la afinidad de Fv4-IgG1 a pH 7,4 es equivalente o mayor que la de WT-IgG1 y la de H54/L28-IgG1, se espera que casi todas las moléculas de SR344 estén unidas a Fv4-IgG1. Aunque Fv4-IgG1 demuestra una retención en plasma equivalente o algo más larga y una menor eliminación en comparación con WT-IgG1 y H54/L28-IgG1, la eliminación del SR344 unido a Fv4-IgG1

fue extremadamente rápida. Esto se puede explicar mediante el concepto de la presente tecnología, el que se muestra en la FIG. 4. En el caso de los anticuerpos convencionales que no demuestran una unión dependiente del pH, un complejo anticuerpo- antígeno soluble es tomado por los endosomas mediante pinocitosis en el plasma, y se une al FcRn expresado en los endosomas bajo las condiciones ácidas dentro de los endosomas. Debido a que el complejo anticuerpo- antígeno soluble unido al FcRn se transfiere desde la superficie celular como tal, y retorna nuevamente al plasma, al antígeno unido al anticuerpo tiene un tiempo de retención en plasma prolongado similar al del anticuerpo (la tasa de eliminación es extremadamente lenta). Por otro lado, en el caso de los anticuerpos que demuestran una unión dependiente del pH, el antígeno se disocia del anticuerpo bajo las condiciones ácidas dentro del endosoma, y por lo tanto solo el anticuerpo se une al FcRn y retorna nuevamente al plasma. Debido a que el antígeno disociado del anticuerpo se degrada en los lisosomas sin retornar al plasma, la eliminación del antígeno es extremadamente rápida en comparación con el caso de los anticuerpos que no demuestran una unión dependiente del pH. Por lo tanto, en el caso de la administración concurrente de SR344 con el anticuerpo WT-IgG1 o H54/L28-IgG1, que no demuestran una unión dependiente del pH, la eliminación de SR344 es lenta con un grado similar a la del anticuerpo, debido a que SR344 se une a WT-IgG1 o H54/L28-IgG1 tanto en plasma como en los endosomas. Por el contrario, en el caso de la administración concurrente de SR344 con el anticuerpo H170/L82-IgG1 o con Fv4-IgG1, los que demuestran una unión dependiente del pH, la eliminación de SR344 es extremadamente rápida, debido a que SR344 se disocia del anticuerpo en el entorno intraendosomal de bajo pH. O sea que, debido a que los anticuerpos H170/L28-IgG1 y Fv4-IgG1, que demuestran una unión dependiente del pH, se disocian de SR344 en el entorno intraendosomal de bajo pH, se espera que la mayoría del H170/L82-IgG1 o del Fv4-IgG1 que haya retornado nuevamente al plasma con FcRn no esté unido a SR344. Por consiguiente, como se muestra en la FIG. 4, se reveló que, mediante la disociación del antígeno en el entorno intraendosomal de bajo pH y mediante el retorno al plasma con FcRn sin una unión al antígeno, un anticuerpo que demuestra una unión dependiente del pH puede unir nuevamente a un antígeno en el plasma. También se demostró que, mediante la repetición de este proceso, un anticuerpo que demuestra una

unión dependiente del pH puede unirse repetidamente a múltiples antígenos. Esto es consistente con los datos de Biacore que se muestran en el Ejemplo 7, los que demuestran que los anticuerpos dependientes del pH pueden unirse repetidamente a los antígenos. Por consiguiente, mediante la potenciación de la unión dependiente del pH de un anticuerpo a un antígeno, se puede incrementar el número de veces a la unión repetitiva al antígeno.

Cuando el antígeno es un antígeno soluble, y el antígeno se une a un anticuerpo bajo las condiciones neutras del plasma, pero se disocia del anticuerpo dentro de los endosomas y con el anticuerpo retornando al plasma junto al FcRn, el anticuerpo puede unirse nuevamente a un antígeno bajo las condiciones neutras del plasma. Por consiguiente, un anticuerpo que tenga la habilidad de disociarse de un antígeno bajo las condiciones ácidas dentro del endosoma se puede unir a antígenos múltiples veces. En comparación a al caso en el cual un antígeno unido a un anticuerpo no se disocia del anticuerpo dentro de los endosomas (o sea, el antígeno unido al anticuerpo retorna al plasma), si un antígeno unido a un anticuerpo se disocia del anticuerpo dentro de los endosomas, se incrementa la tasa de eliminación plasmática del antígeno, debido a que el antígeno se transporta a los lisosomas y se degrada. Por consiguiente, la tasa de eliminación plasmática de un antígeno se puede usar como un índice para determinar si un anticuerpo puede unir a un antígeno múltiples veces. La determinación de la tasa de eliminación plasmática de un antígeno se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante la administración de un antígeno y un anticuerpo *in vivo*, y luego mediante la medida de la concentración de antígeno en plasma luego de la administración, como se muestra en los ejemplos.

Un anticuerpo que demuestra una unión dependiente del pH puede unirse repetidamente a múltiples antígenos en contraste con el caso de un anticuerpo convencional que no demuestra una unión dependiente del pH. Por consiguiente, se puede reducir considerablemente la cantidad de anticuerpo que se administra, y se pueden prolongar los intervalos de administración en gran medida.

La unión repetitiva a múltiples antígenos de este mecanismo se basa en una reacción antígeno- anticuerpo que es dependiente del pH. Por consiguiente, sin importar el tipo de antígeno, si se puede construir un anticuerpo que demuestre una unión

dependiente del pH para unir a un antígeno al pH 7,4 del plasma pero para disociarse del antígeno al pH ácido dentro de los endosomas, entonces dicho anticuerpo se puede unir repetidamente a múltiples antígenos. Por consiguiente, la presente tecnología es útil en que se la puede aplicar no solo a anticuerpos hacia el receptor de IL-6, a IL-6, o al receptor de IL-31, sino que en general a cualquier anticuerpo contra cualquier antígeno, sin importar el tipo de antígeno.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión al antígeno, CARACTERIZADA PORQUE tiene un valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$, definido como la relación entre la KD del antígeno a pH 5,8 y la KD del antígeno a pH 7,4, de 2 o más.
2. La molécula de unión al antígeno de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ es de 10 o más.
3. La molécula de unión al antígeno de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ es de 40 o más.
4. La molécula de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, CARACTERIZADA PORQUE al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno ha sido sustituido por histidina, o se ha insertado al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno.
5. La molécula de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, CARACTERIZADA PORQUE tiene actividad antagónica.
6. La molécula de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, CARACTERIZADA PORQUE se une a un antígeno de membrana o un antígeno soluble.
7. La molécula de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, CARACTERIZADA PORQUE es un anticuerpo.
8. Una composición farmacéutica CARACTERIZADA PORQUE comprende la molécula de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Un método para mejorar la farmacocinética de una molécula de unión al antígeno, CARACTERIZADO PORQUE comprende reducir la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 5,8, en comparación con la actividad a pH 7,4.
10. Un método para incrementar la cantidad de veces que se une a los antígenos una molécula de unión al antígeno, CARACTERIZADO PORQUE comprende reducir la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 5,8, en comparación con la actividad a pH 7,4.
11. Un método para incrementar la cantidad de antígenos a los que puede unirse una molécula de unión al antígeno, CARACTERIZADO PORQUE comprende reducir la

actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 5,8, en comparación con la actividad a pH 7,4.

12. Un método para disociar, dentro de una célula, un antígeno de una molécula de unión al antígeno que se unió desde el exterior de la célula, CARACTERIZADO PORQUE comprende reducir la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 5,8, en comparación con la actividad a pH 7,4.

13. Un método para liberar de la célula una molécula de unión al antígeno que ha estado unida a un antígeno y ha sido internalizada en una célula, en una forma libre de antígeno, CARACTERIZADO PORQUE comprende reducir la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 5,8, en comparación con la actividad a pH 7,4.

14. Un método para incrementar la capacidad de una molécula de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma, CARACTERIZADO PORQUE comprende reducir la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a pH 5,8, en comparación con la actividad a pH 7,4.

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, CARACTERIZADO PORQUE el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$, definido como la relación entre la KD del antígeno a pH 5,8 y la KD del antígeno a pH 7,4, es de 2 o más.

16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, CARACTERIZADO PORQUE el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ es de 10 o más.

17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, CARACTERIZADO PORQUE el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ es de 40 o más.

18. Un método para mejorar la farmacocinética de una molécula de unión al antígeno, CARACTERIZADO PORQUE comprende sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno por histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno.

19. Un método para incrementar la cantidad de veces que se une a los antígenos una molécula de unión al antígeno, CARACTERIZADO PORQUE comprende sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno por histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno.

20. Un método para incrementar la cantidad de antígenos a los que puede unirse una molécula de unión al antígeno, CARACTERIZADO PORQUE comprende sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno por histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno.
21. Un método para disociar, dentro de una célula, un antígeno de una molécula de unión al antígeno que se unió desde el exterior de la célula, CARACTERIZADO PORQUE comprende sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno por histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno.
22. Un método para liberar de la célula una molécula de unión al antígeno que ha estado unida a un antígeno y ha sido internalizada en una célula, en una forma libre de antígeno, CARACTERIZADO PORQUE comprende sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno por histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno.
23. Un método para incrementar la capacidad de una molécula de unión al antígeno de eliminar antígenos en plasma, CARACTERIZADO PORQUE comprende sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno por histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno.
24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23, CARACTERIZADO PORQUE la sustitución por histidina o la inserción de histidina incrementan el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$, definido como la relación entre la actividad de unión al antígeno a pH 5,8 y la actividad de unión al antígeno a pH 7,4, en comparación con el valor de $KD(pH\ 5,8)/KD(pH\ 7,4)$ antes de la sustitución por histidina o la inserción de histidina.
25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 24, CARACTERIZADO PORQUE la molécula de unión al antígeno tiene actividad antagónica.
26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 25, CARACTERIZADO PORQUE la molécula de unión al antígeno se une a un antígeno de membrana o un antígeno soluble.
27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 26, CARACTERIZADO PORQUE la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo.

28. Un método para buscar una molécula de unión al antígeno, CARACTERIZADO PORQUE comprende los siguientes pasos:

- (a) determinar la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a un pH de entre 6,7 y 10,0;
- (b) determinar la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a un pH de entre 4,0 y 6,5; y
- (c) seleccionar una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a un pH de entre 6,7 y 10,0 es mayor que su actividad de unión al antígeno a un pH de entre 4,0 y 6,5.

29. El método de búsqueda de la reivindicación 28, CARACTERIZADO PORQUE comprende el paso de seleccionar un anticuerpo cuya actividad de unión al antígeno a un pH de entre 6,7 y 10,0 es el doble o más de la actividad de unión al antígeno a un pH de entre 4,0 y 6,5.

30. Un método para buscar una molécula de unión al antígeno, CARACTERIZADO PORQUE comprende los siguientes pasos:

- (a) unir una molécula de unión al antígeno a un antígeno bajo una condición con un pH de entre 6,7 y 10,0;
- (b) colocar la molécula de unión al antígeno unida al antígeno de (a) bajo una condición con un pH de entre 4,0 y 6,5; y
- (c) obtener una molécula de unión al antígeno disociada bajo una condición con un pH de entre 4,0 y 6,5.

31. Un método para buscar una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH es mayor que a un segundo pH, CARACTERIZADO PORQUE comprende los siguientes pasos:

- (a) unir una molécula de unión al antígeno a una columna con un antígeno inmovilizado bajo una condición con el primer pH;
- (b) eluir la molécula de unión al antígeno unida a la columna al primer pH de la columna, bajo una condición con el segundo pH; y
- (c) recolectar la molécula de unión al antígeno eluida.

32. Un método para buscar una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH es mayor que a un segundo pH, CARACTERIZADO PORQUE comprende los siguientes pasos:

- (a) unir una biblioteca de moléculas de unión al antígeno a una columna con un antígeno inmovilizado bajo una condición con el primer pH;
- (b) eluir la molécula de unión al antígeno de la columna bajo una condición con el segundo pH;
- (c) amplificar el gen que codifica la molécula de unión al antígeno eluida; y
- (d) obtener la molécula de unión al antígeno eluida.

33. El método de búsqueda de la reivindicación 31 ó 32, CARACTERIZADO PORQUE el primer pH es de entre 6,7 y 10,0, y el segundo pH es de entre 4,0 y 6,5.

34. El método de búsqueda de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33, CARACTERIZADO PORQUE al menos uno o más aminoácidos de la molécula de unión al antígeno han sido sustituidos por histidina, o se ha insertado al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno.

35. El método de búsqueda de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33, CARACTERIZADO PORQUE es para obtener una molécula de unión al antígeno que es superior en términos de retención en plasma.

36. El método de búsqueda de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33, CARACTERIZADO PORQUE es para obtener una molécula de unión al antígeno que es capaz de unirse a un antígeno dos o más veces.

37. El método de búsqueda de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33, CARACTERIZADO PORQUE es para obtener una molécula de unión al antígeno que es capaz de unirse a más antígenos, en comparación con la cantidad de sitios de unión al antígeno que posee.

38. El método de búsqueda de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33, CARACTERIZADO PORQUE es para obtener una molécula de unión al antígeno que se disocia, dentro de una célula, de un antígeno unido desde el exterior de la célula.

39. El método de búsqueda de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33, CARACTERIZADO PORQUE es para obtener una molécula de unión al antígeno que

está unida a un antígeno y ha sido internalizada en una célula, y que luego ha sido liberada de la célula en una forma libre de antígeno.

40. El método de búsqueda de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33, CARACTERIZADO PORQUE es para obtener una molécula de unión al antígeno que presenta una capacidad mejorada de eliminar antígenos en plasma.

41. El método de búsqueda de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 40, CARACTERIZADO PORQUE la molécula de unión al antígeno está formulada como una composición farmacéutica.

42. El método de búsqueda de cualquiera de las reivindicaciones 28 a 41, CARACTERIZADO PORQUE la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo.

43. Un método para producir una molécula de unión al antígeno CARACTERIZADO PORQUE comprende los siguientes pasos:

- (a) determinar la actividad de unión al antígeno de una molécula de unión al antígeno a un pH de entre 6,7 y 10,0;
- (b) determinar la actividad de unión al antígeno de la molécula de unión al antígeno a un pH de entre 4,0 y 6,5;
- (c) seleccionar la molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión al antígeno a un pH de entre 6,7 y 10,0 es mayor que a un pH de entre 4,0 y 6,5;
- (d) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno seleccionada en (c);
y
- (e) producir la molécula de unión al antígeno usando el gen obtenido en (d).

44. Un método para producir una molécula de unión al antígeno CARACTERIZADO PORQUE comprende los siguientes pasos:

- (a) unir una molécula de unión al antígeno a un antígeno bajo una condición con un pH de entre 6,7 y 10,0;
- (b) permitir que la molécula de unión al antígeno unida al antígeno de (a) repose bajo una condición con un pH de entre 4,0 y 6,5;
- (c) recolectar la molécula de unión al antígeno disociada bajo una condición con un pH de entre 4,0 y 6,5;
- (d) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno obtenida en (c); y

(e) producir la molécula de unión al antígeno usando el gen obtenido en (d).

45. Un método para producir una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH es mayor que a un segundo pH, CARACTERIZADO PORQUE comprende los siguientes pasos:

(a) unir una molécula de unión al antígeno a una columna con un antígeno inmovilizado bajo una condición con un primer pH;

(b) eluir de la columna la molécula de unión al antígeno, que se había unido a la columna al primer pH, bajo una condición con un segundo pH;

(c) recolectar la molécula de unión al antígeno eluida;

(d) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno obtenida en (c); y

(e) producir la molécula de unión al antígeno usando el gen obtenido en (d).

46. Un método para producir una molécula de unión al antígeno cuya actividad de unión a un primer pH es mayor que a un segundo pH, CARACTERIZADO PORQUE comprende los siguientes pasos:

(a) unir una biblioteca de moléculas de unión al antígeno a una columna con un antígeno inmovilizado bajo una condición con un primer pH;

(b) eluir la molécula de unión al antígeno de la columna bajo una condición con un segundo pH;

(c) amplificar el gen que codifica la molécula de unión al antígeno eluida;

(d) recolectar la molécula de unión al antígeno eluida;

(e) obtener el gen que codifica la molécula de unión al antígeno recolectada en (d); y

(f) producir la molécula de unión al antígeno usando el gen obtenido en (e).

47. El método de producción de la reivindicación 45 ó 46, CARACTERIZADO PORQUE el primer pH es de entre 6,7 y 10,0, y el segundo pH es de entre 4,0 y 6,5.

48. El método de producción de cualquiera de las reivindicaciones 43 a 47, CARACTERIZADO PORQUE comprende además el paso de sustituir al menos un aminoácido de la molécula de unión al antígeno por histidina, o insertar al menos una histidina en la molécula de unión al antígeno.

49. El método de producción de cualquiera de las reivindicaciones 43 a 47, CARACTERIZADO PORQUE la molécula de unión al antígeno es un anticuerpo.

50. Una composición farmacéutica CARACTERIZADA PORQUE comprende una molécula de unión al antígeno producida con el método de producción de cualquiera de las reivindicaciones 43 a 49.

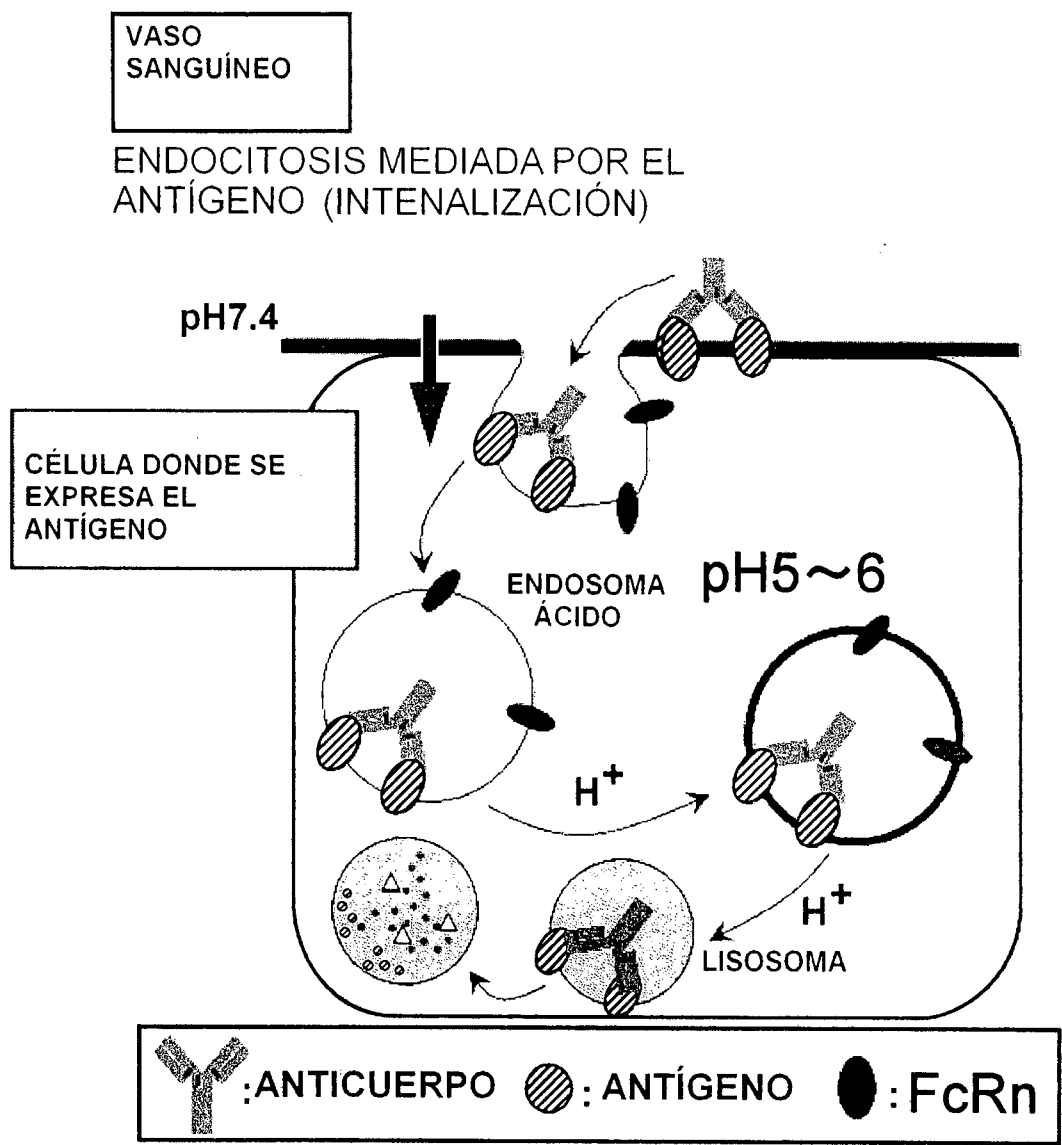


FIG. 1

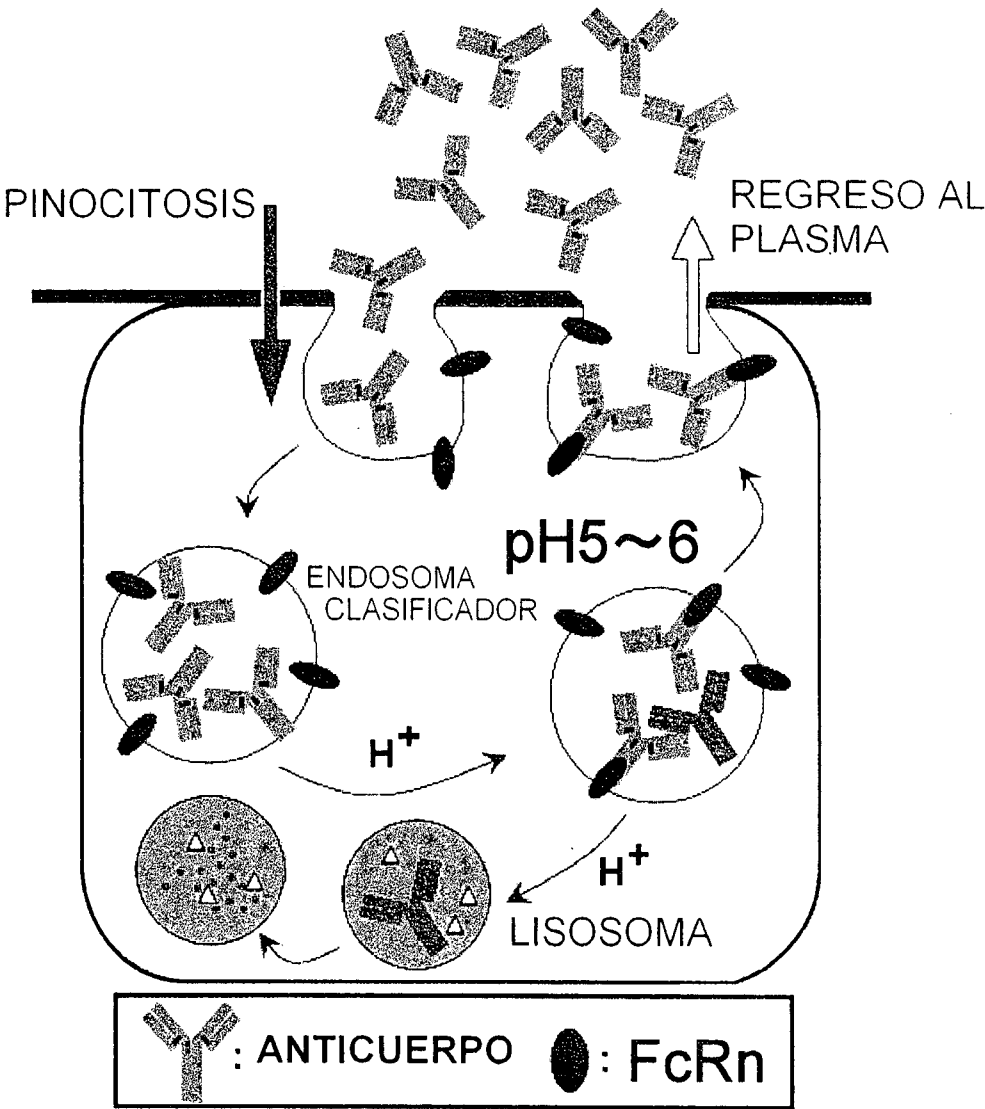
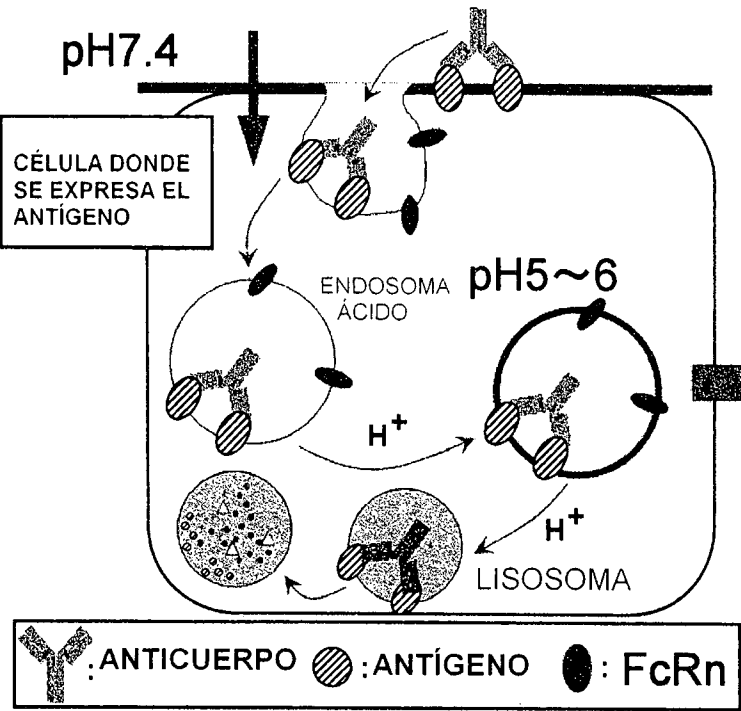


FIG. 2

VASO SANGUÍNEO

ENDOSITOSIS MEDIADA POR EL ANTÍGENO (INTERNALIZACIÓN)



ANTICUERPOS LIBRES QUE SE UNEN A OTROS ANTÍGENOS

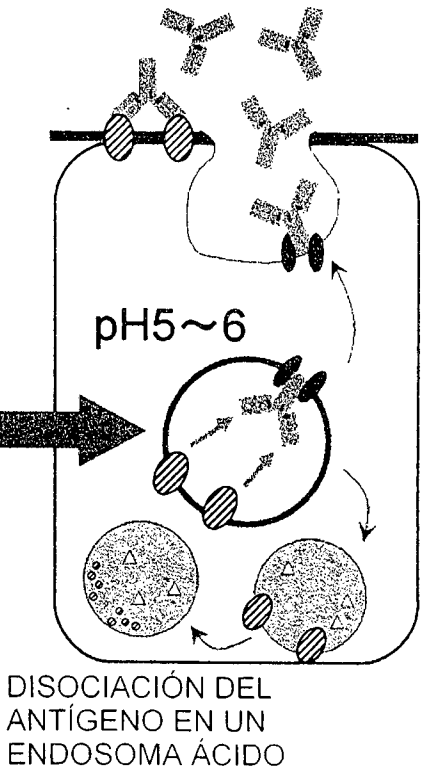


FIG. 3

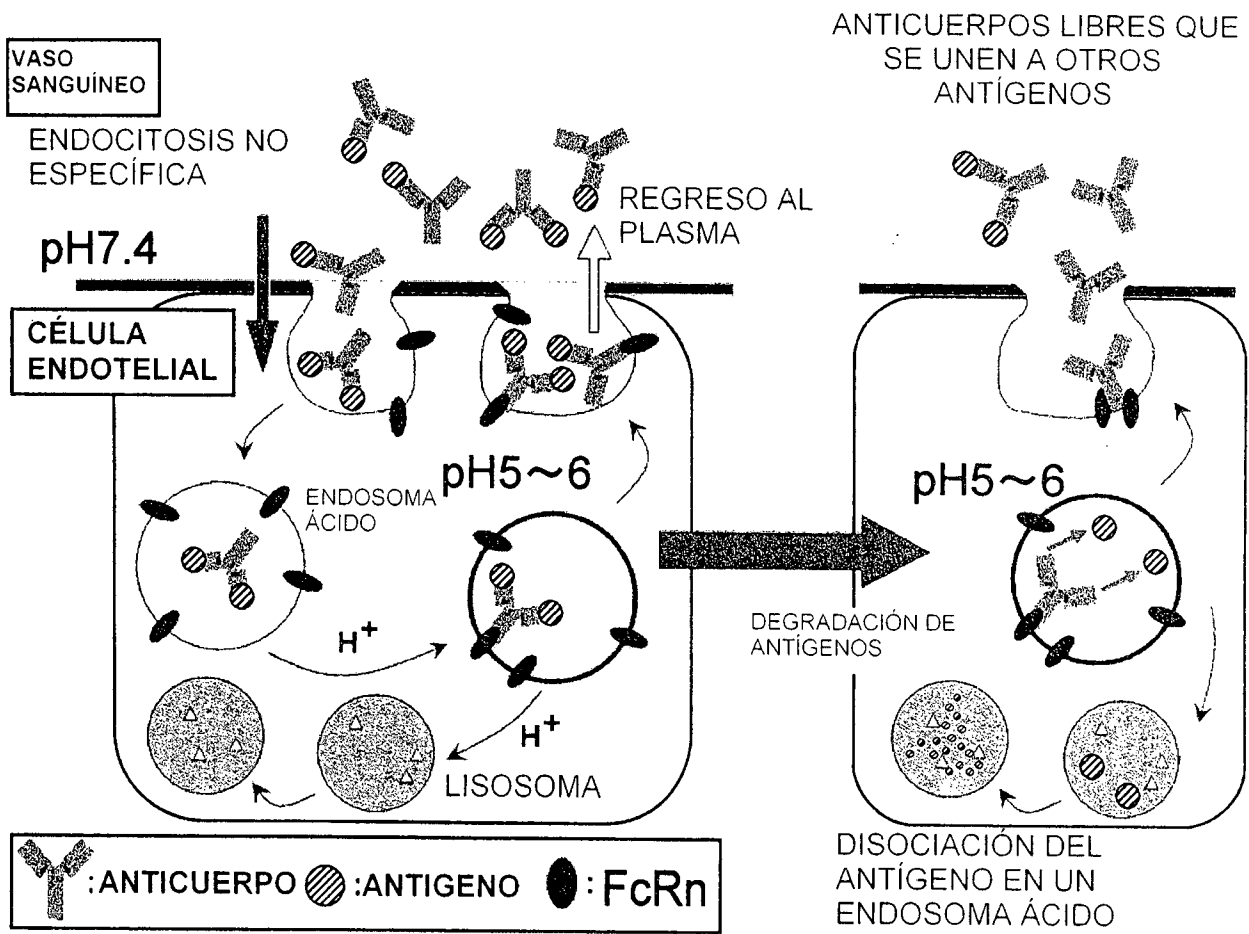


FIG. 4

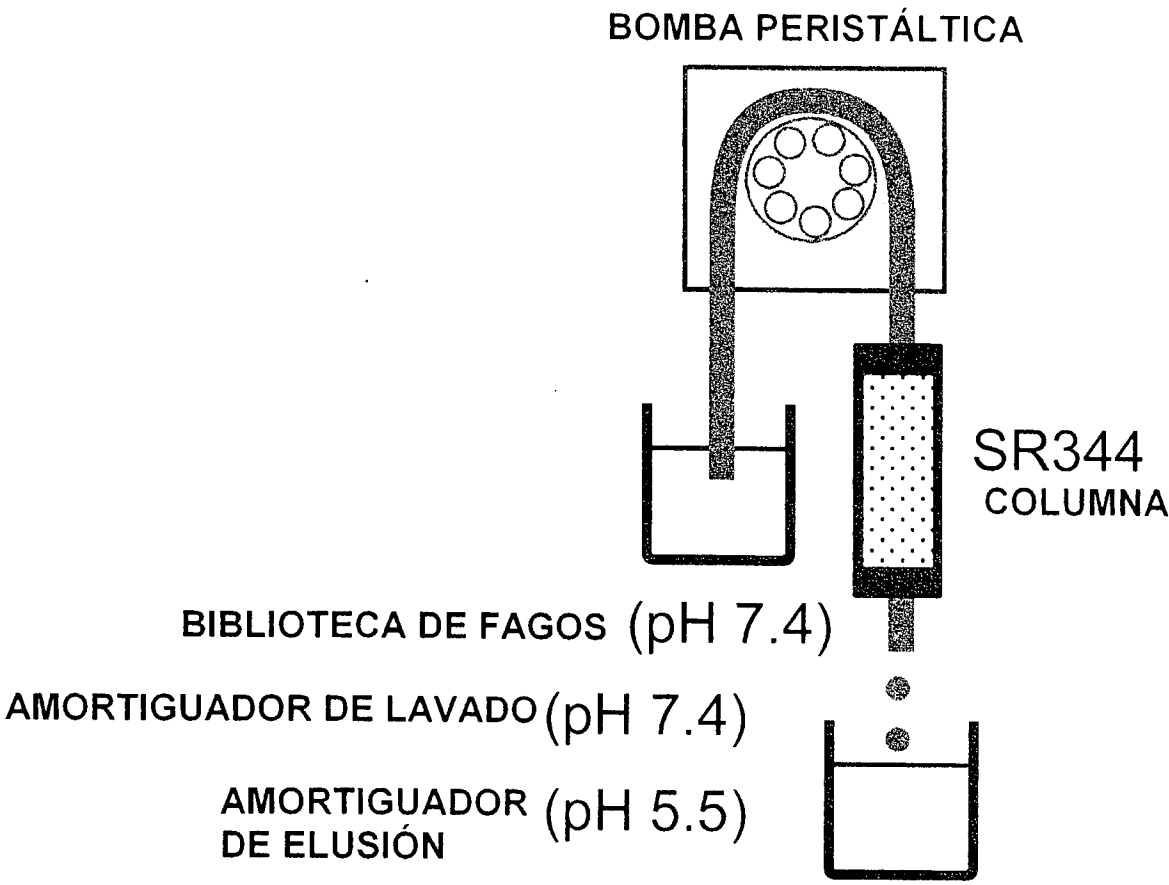


FIG. 5

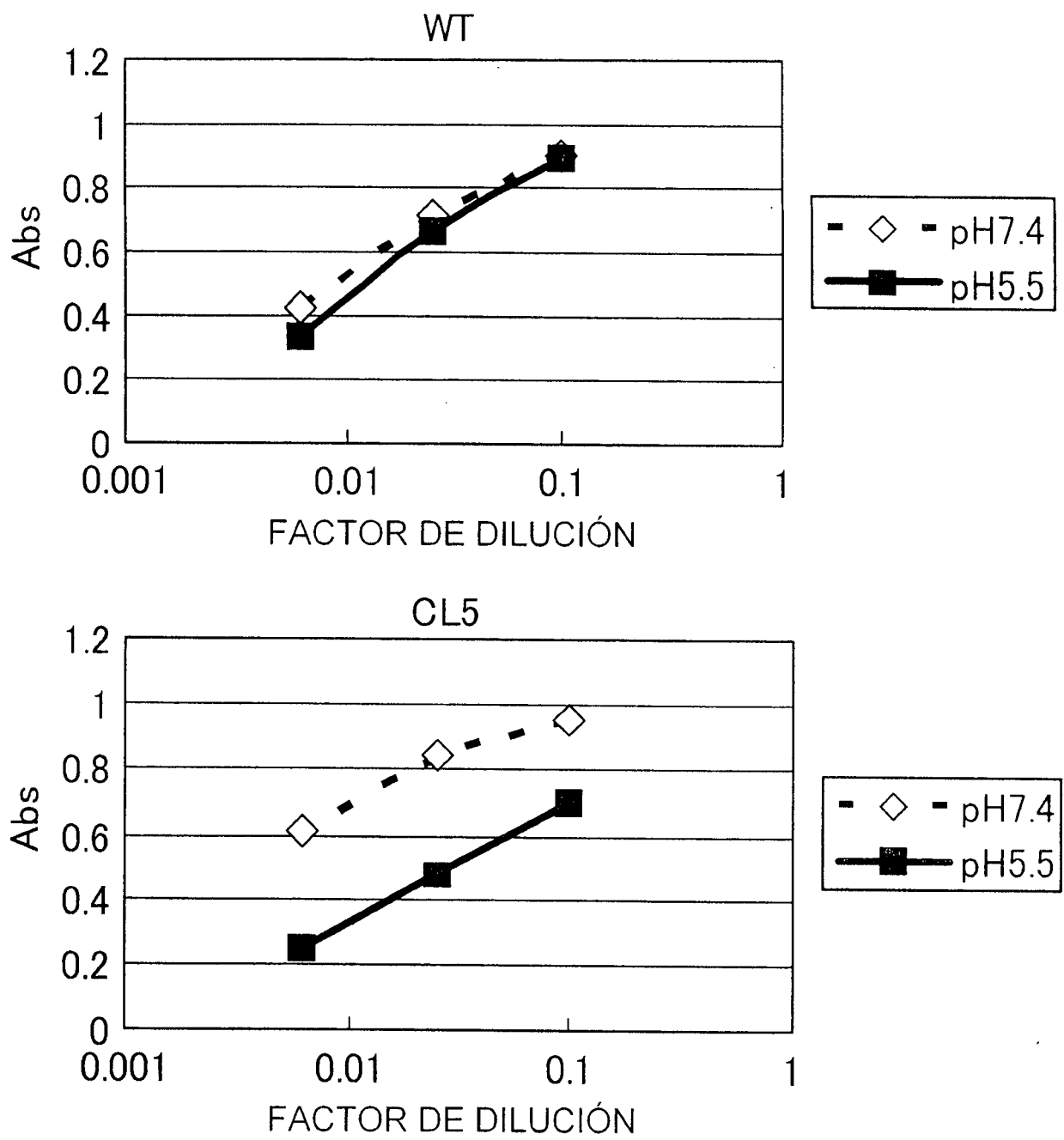


FIG. 6

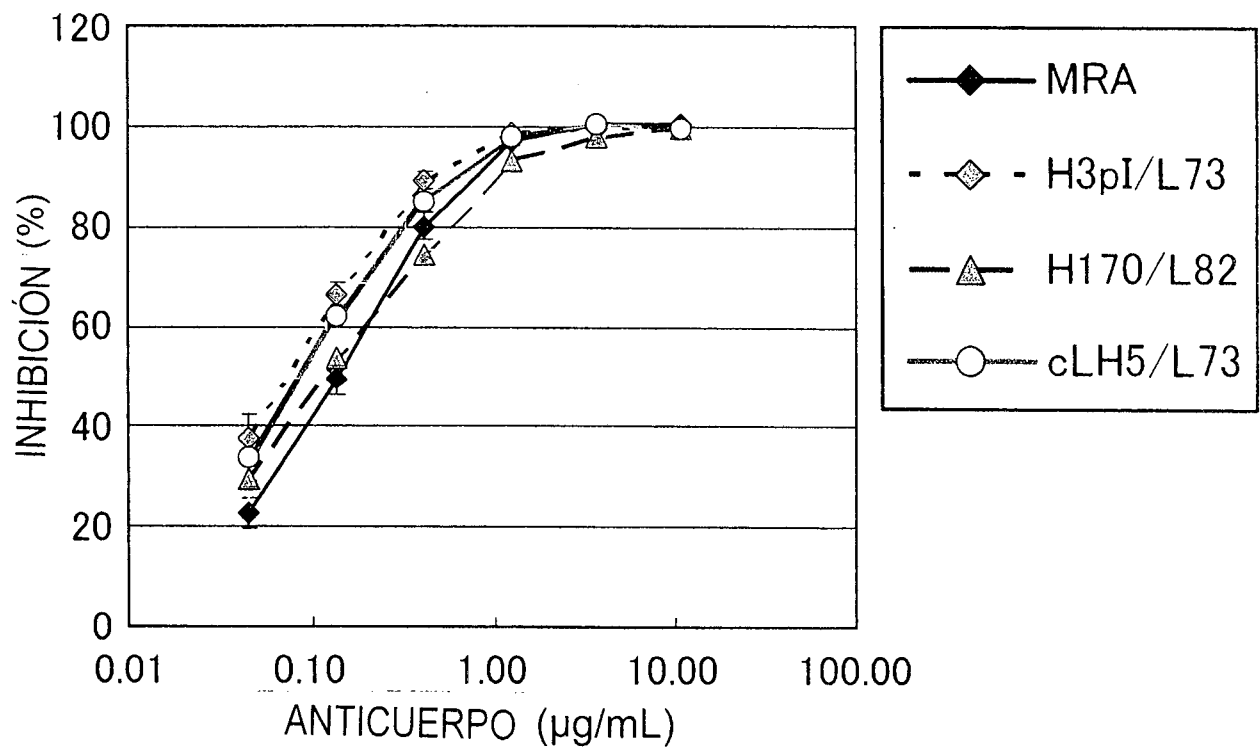


FIG. 7

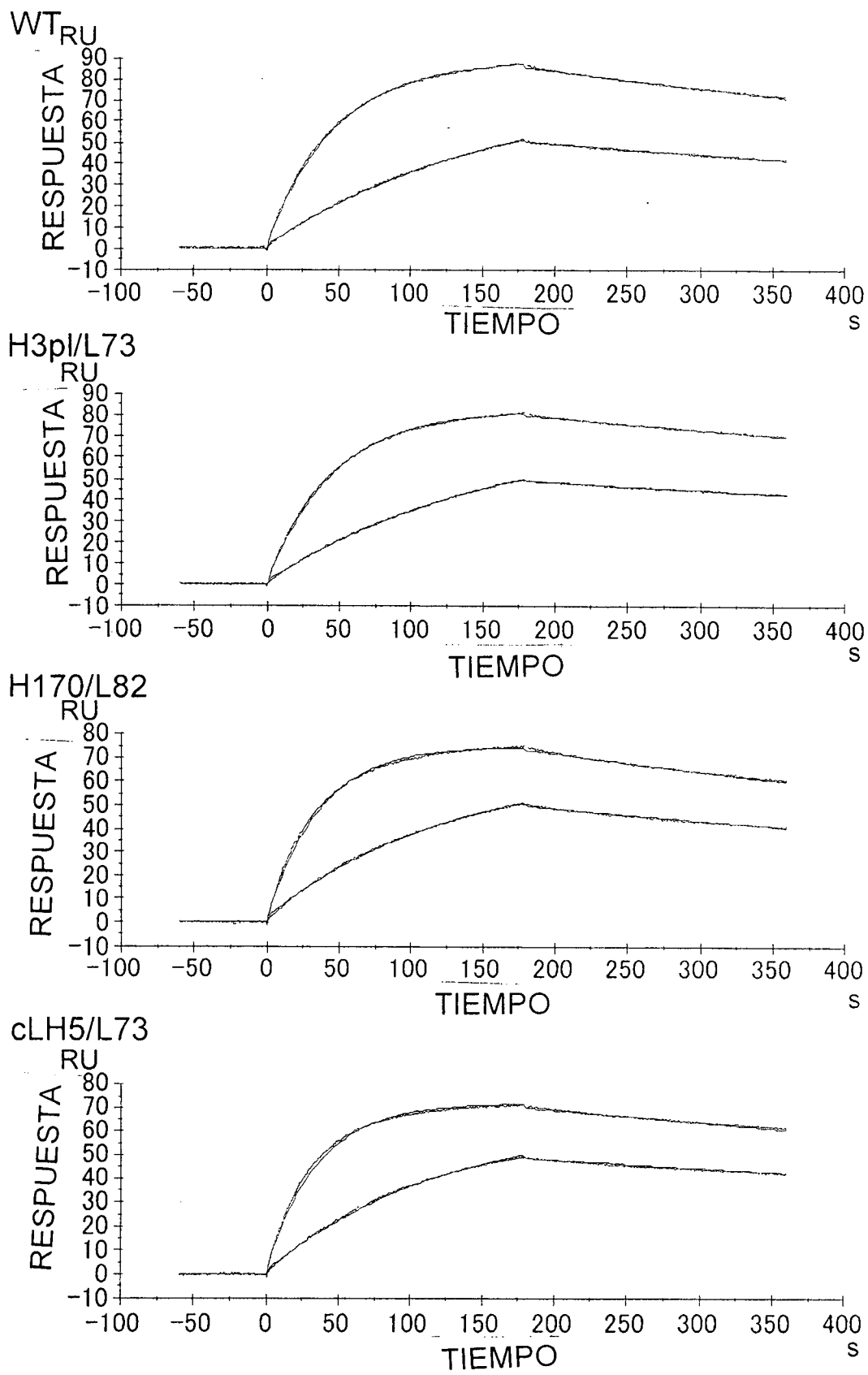


FIG. 8

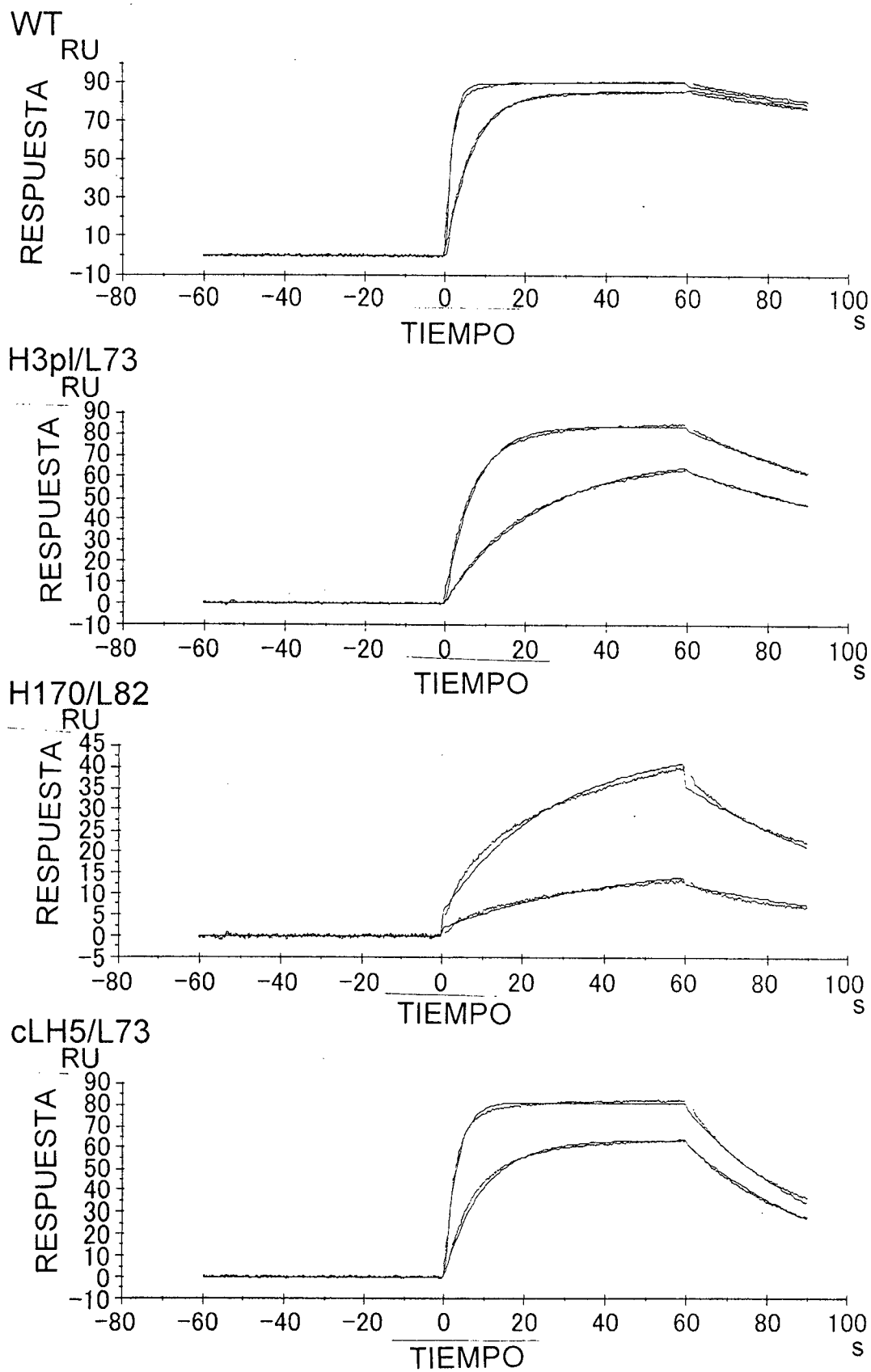


FIG. 9

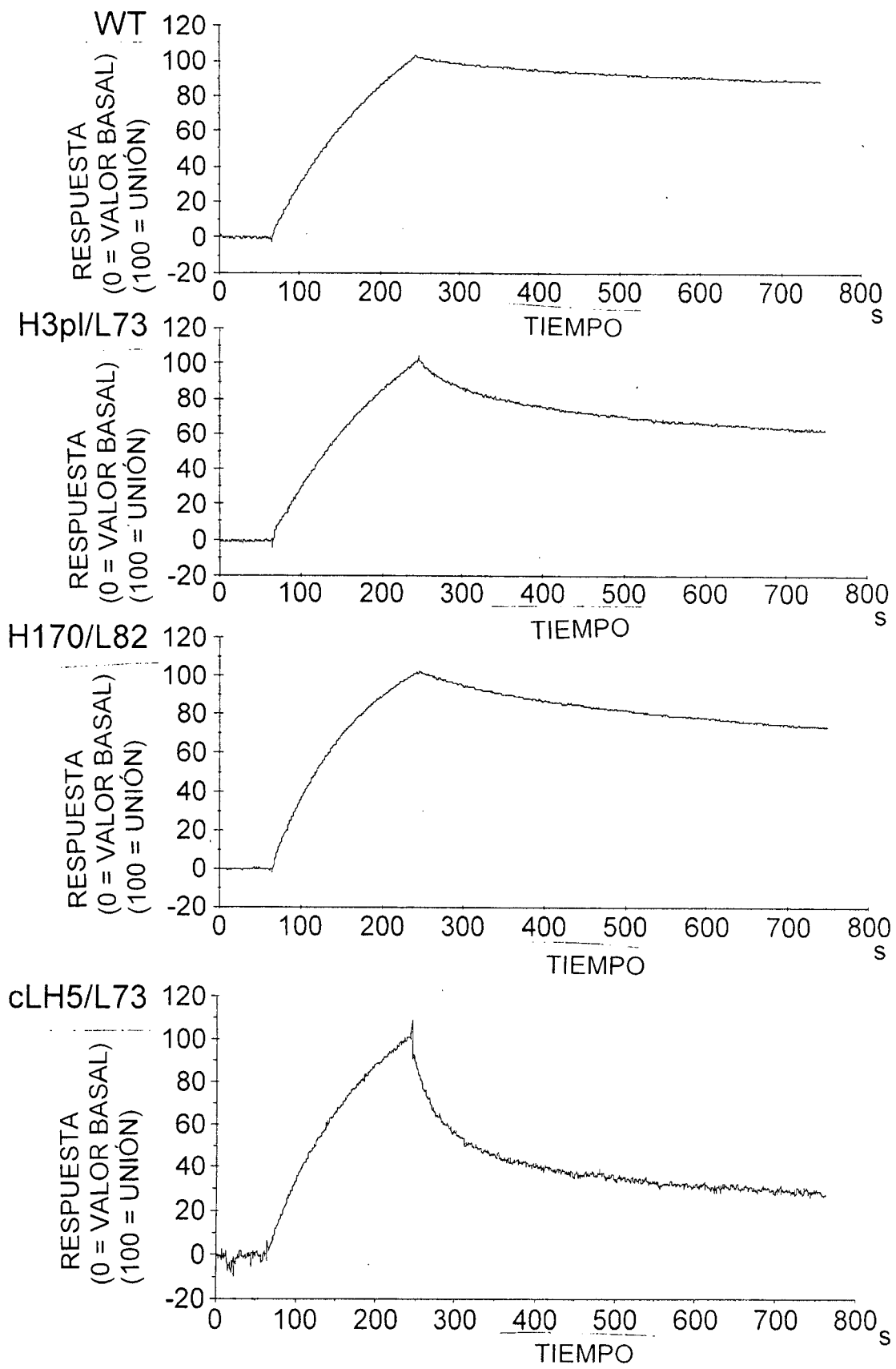


FIG. 10

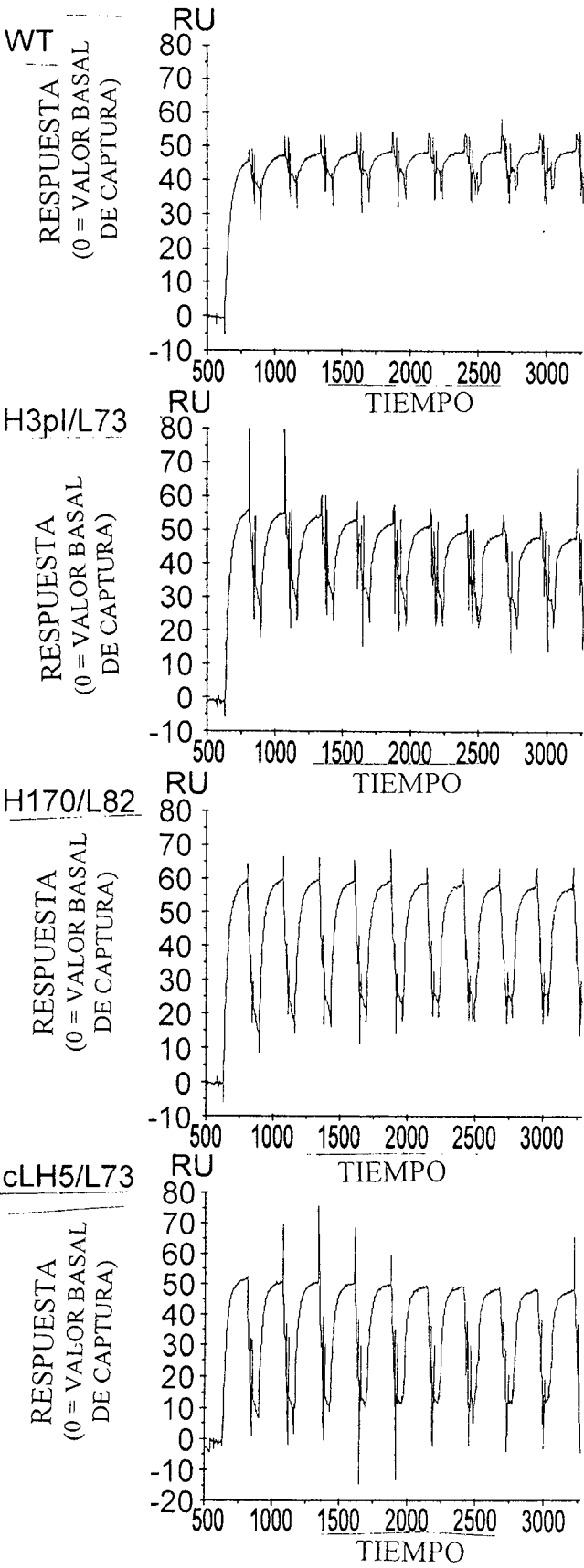


FIG. 11

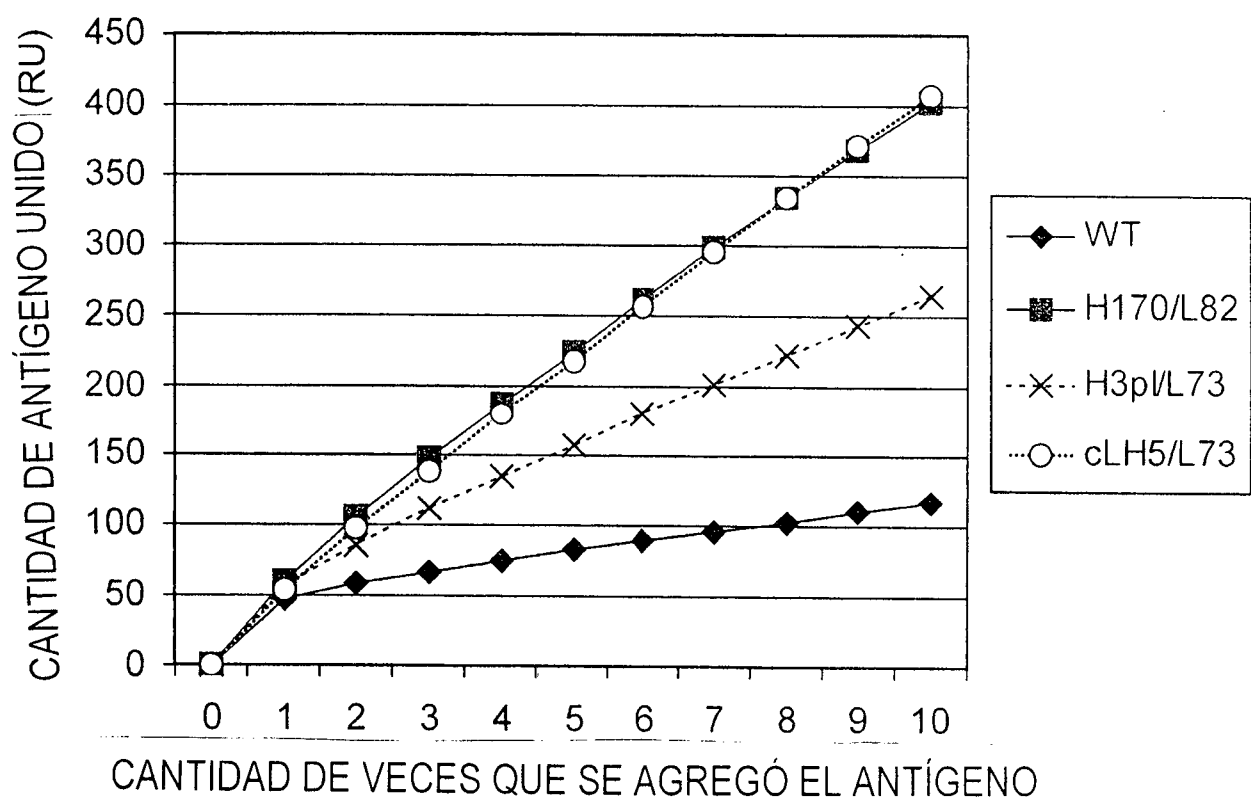


FIG. 12

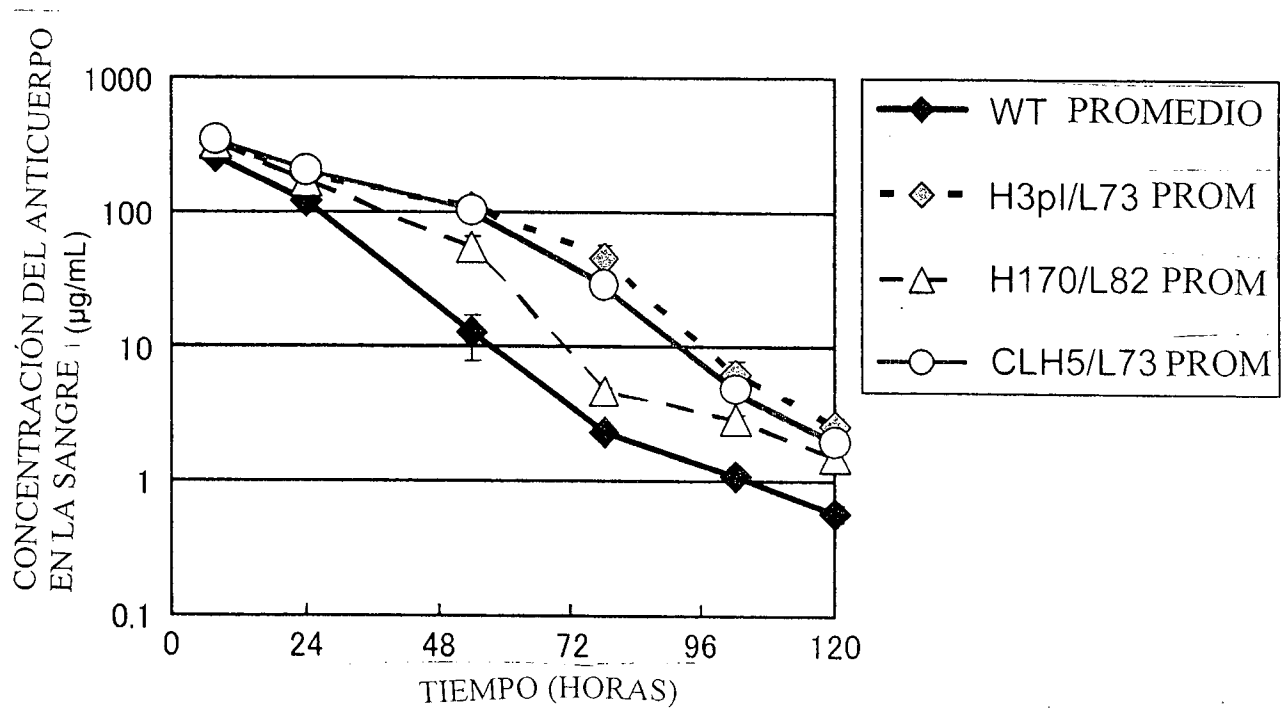


FIG. 13

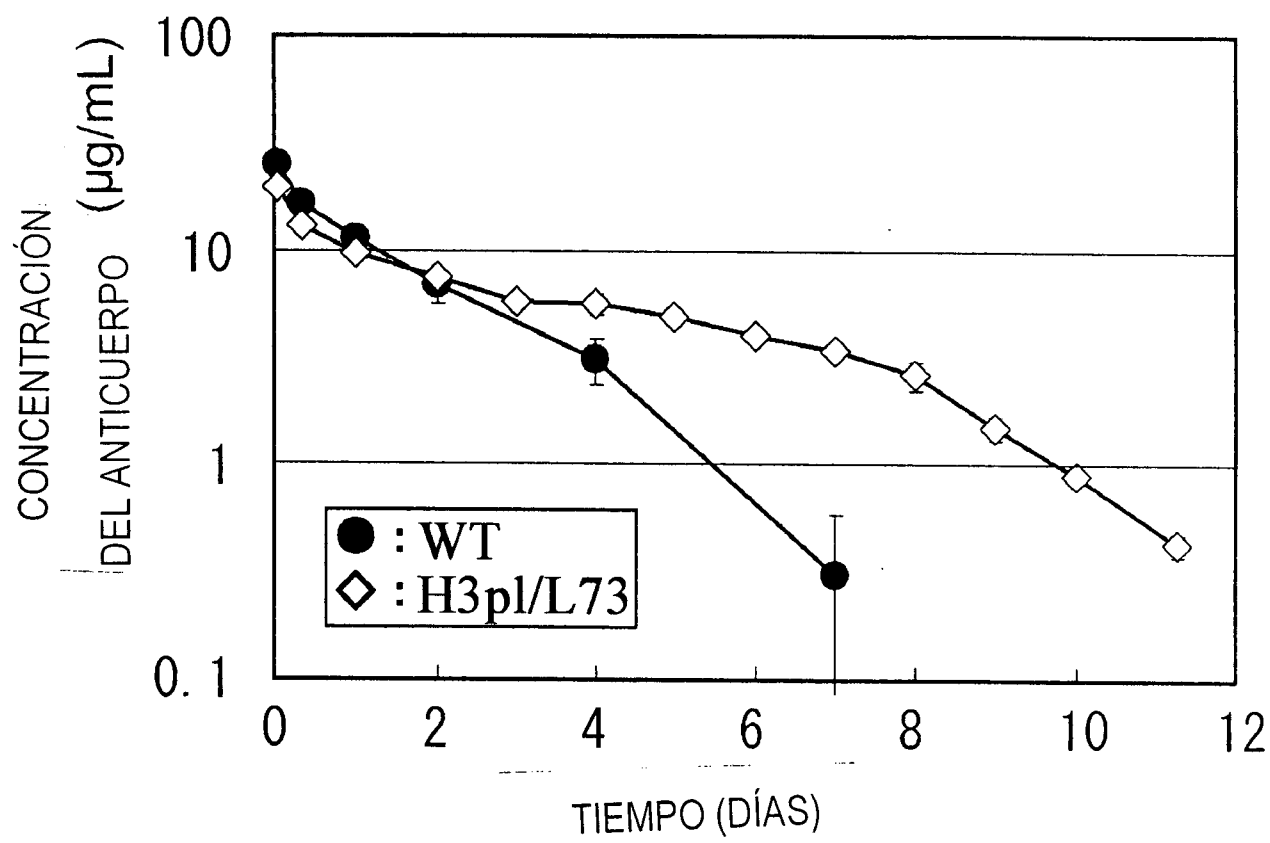


FIG. 14

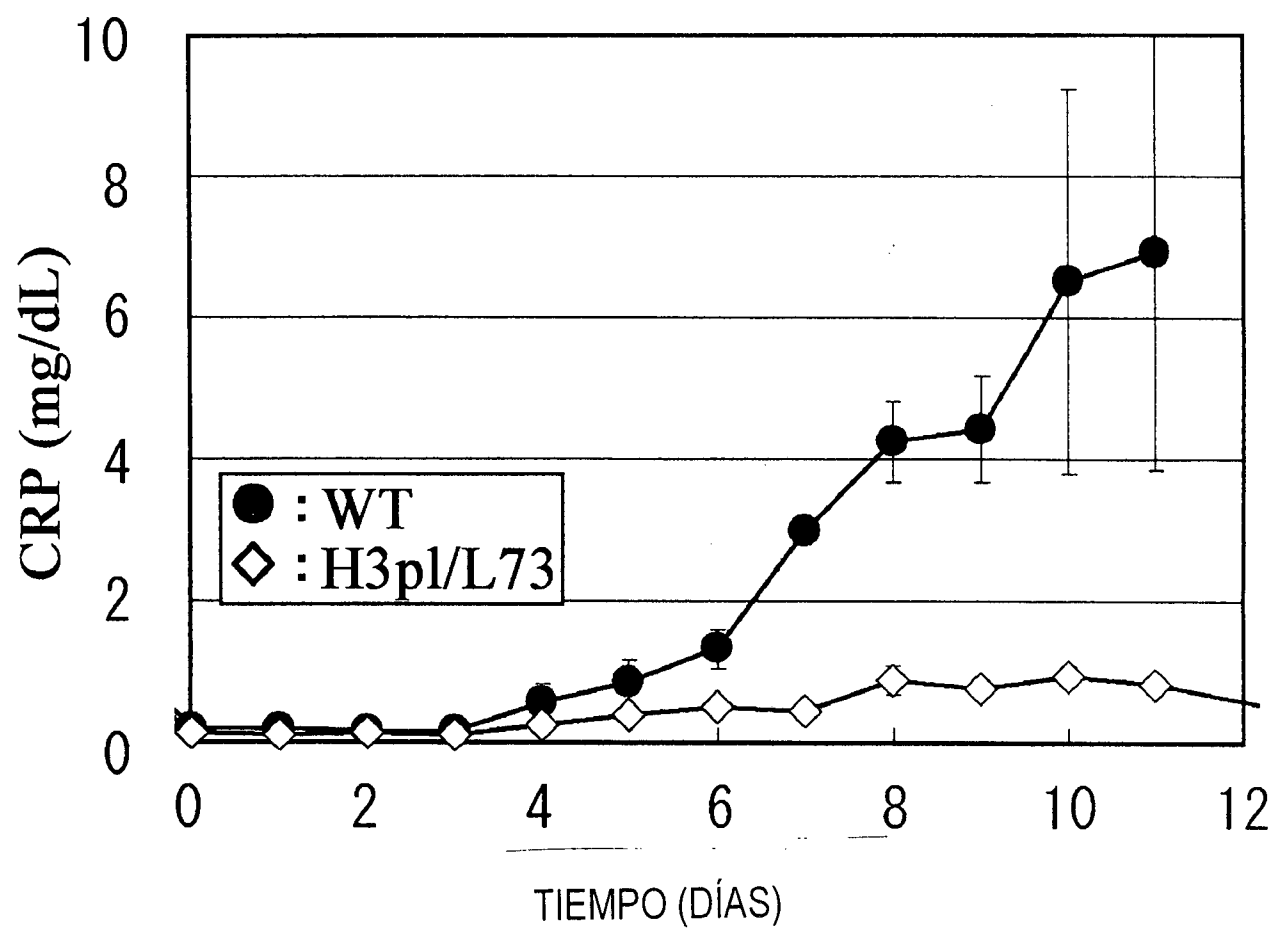


FIG. 15

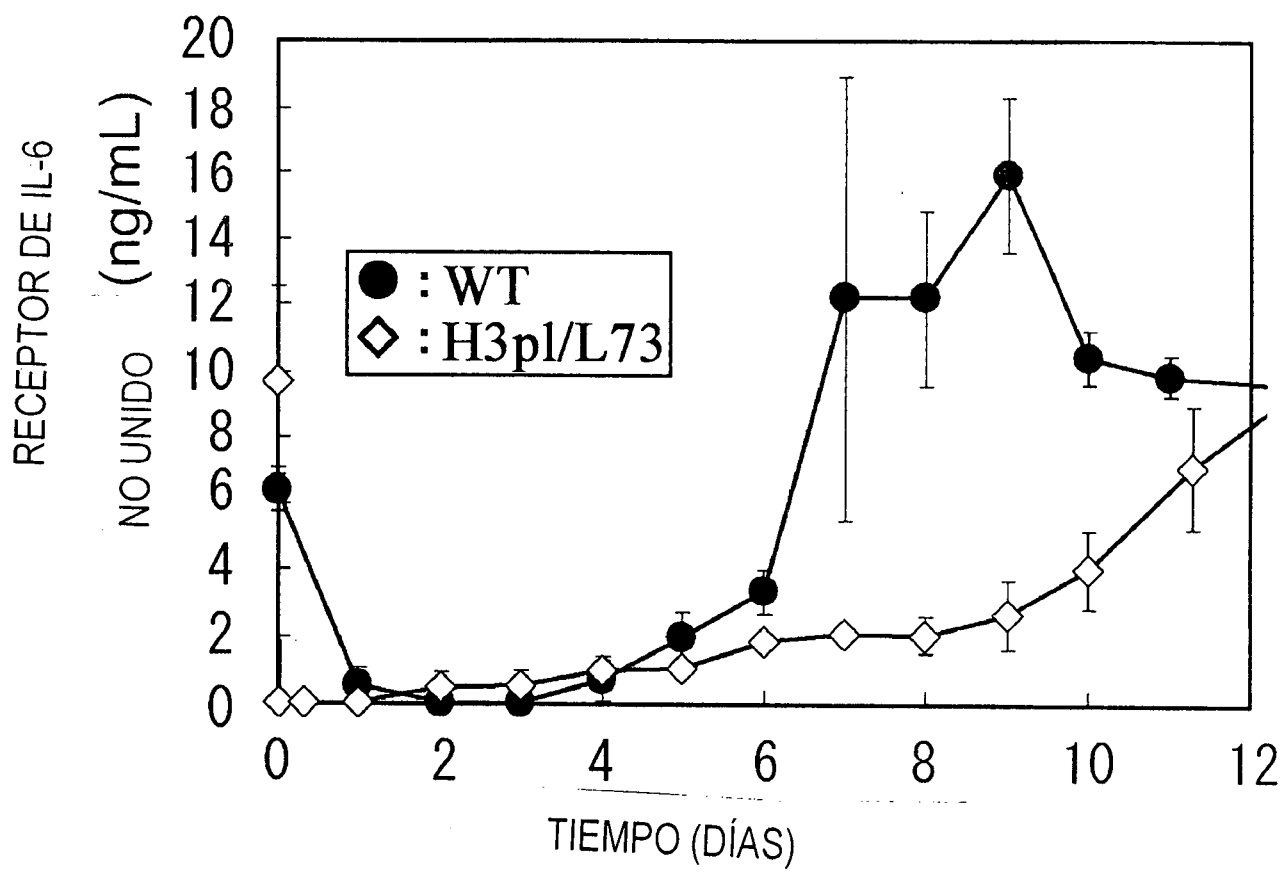


FIG. 16

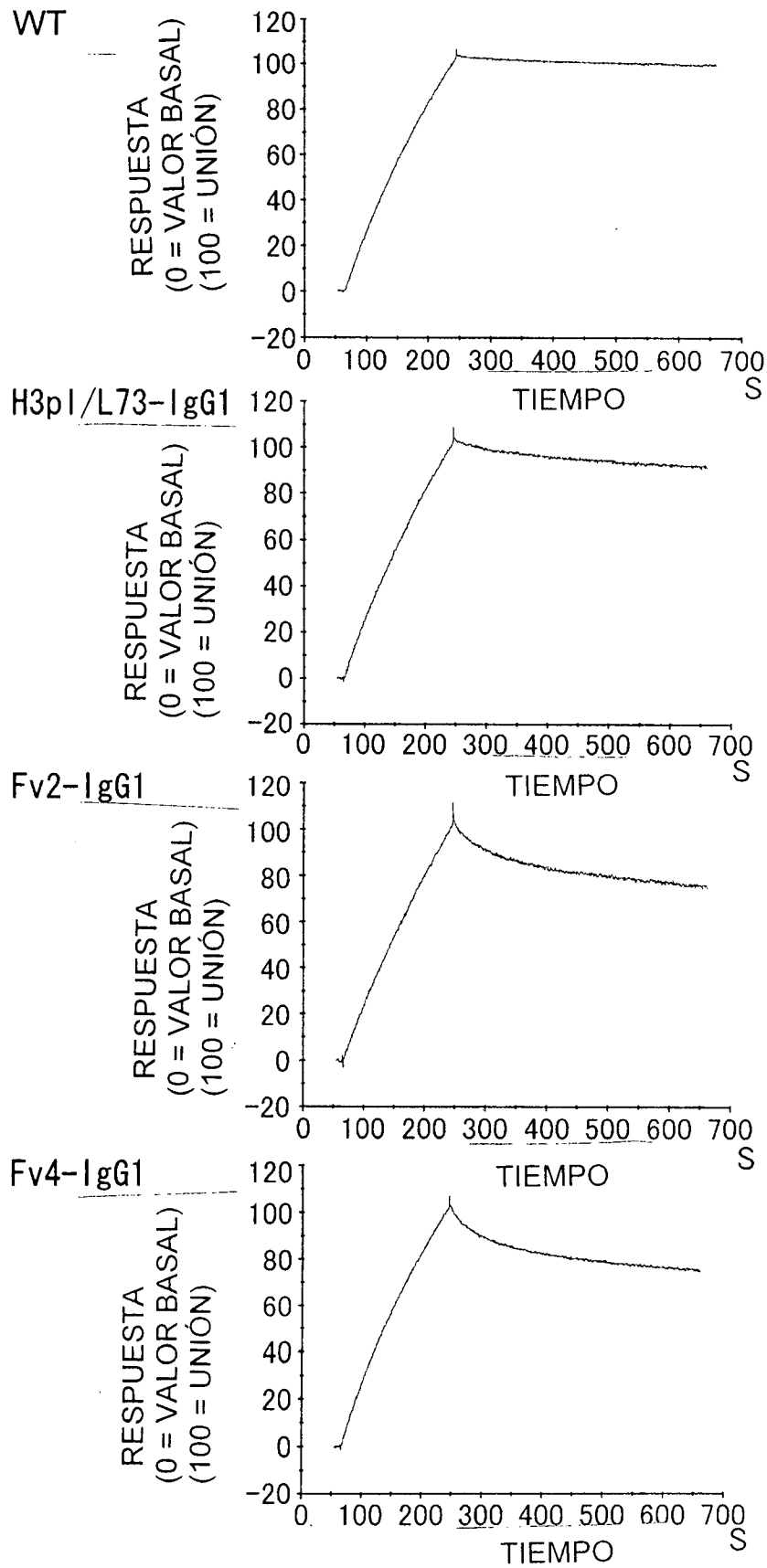


FIG. 17

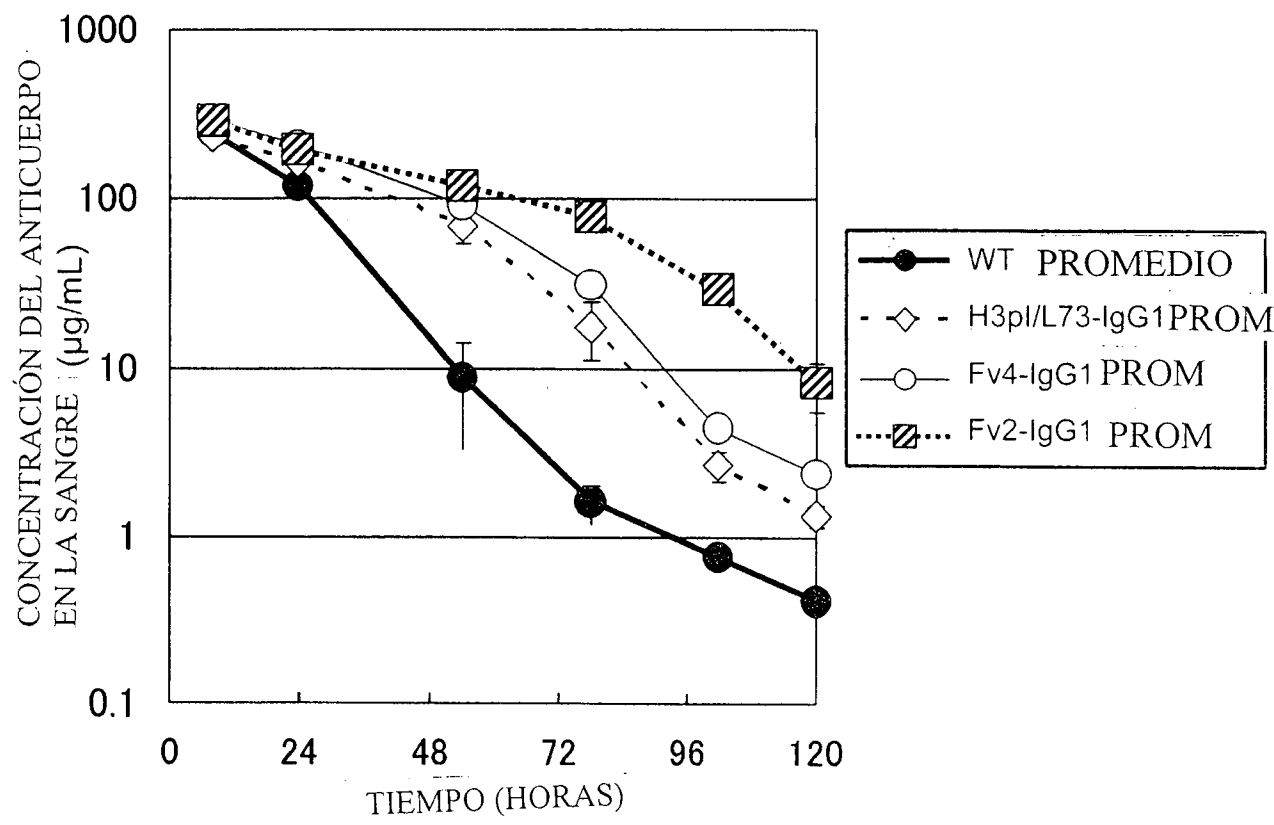


FIG. 18

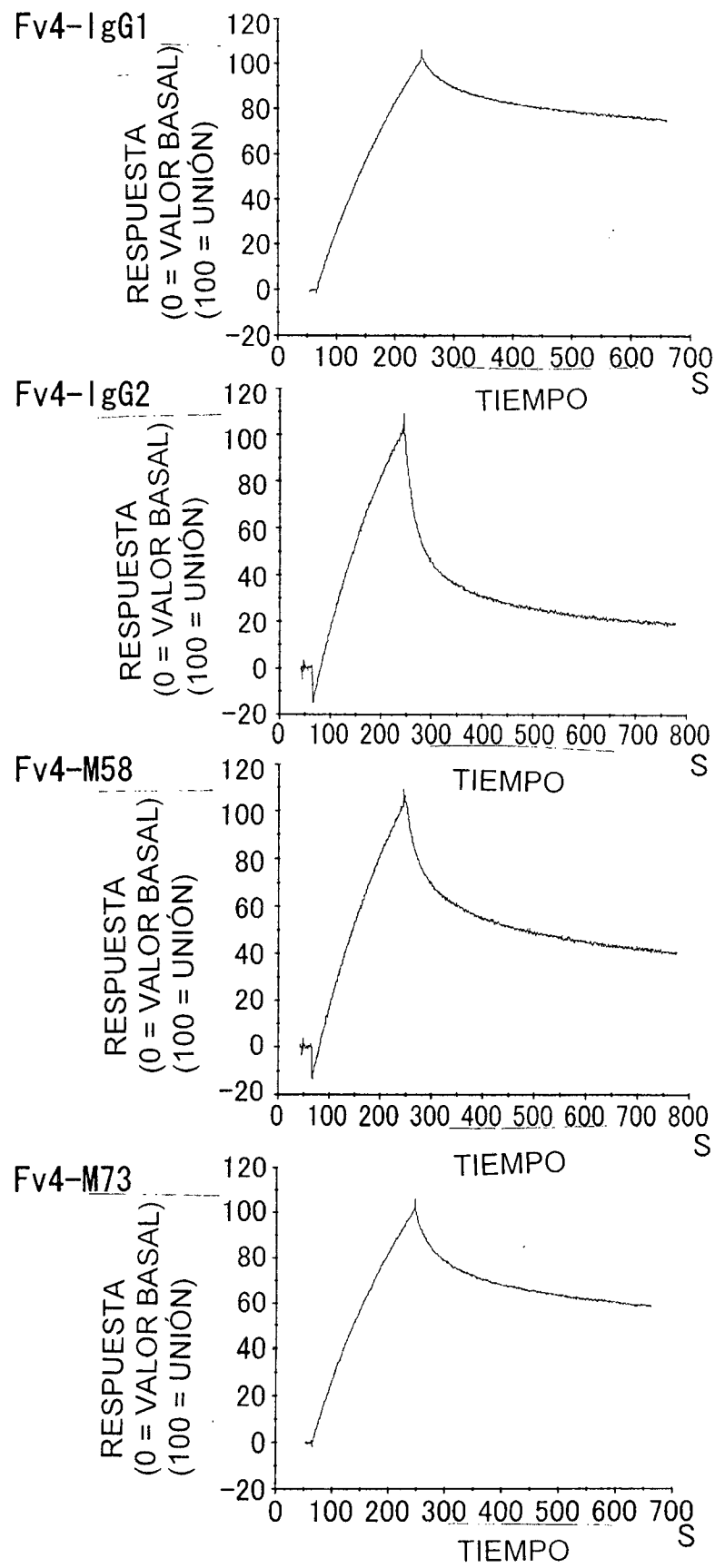


FIG. 19

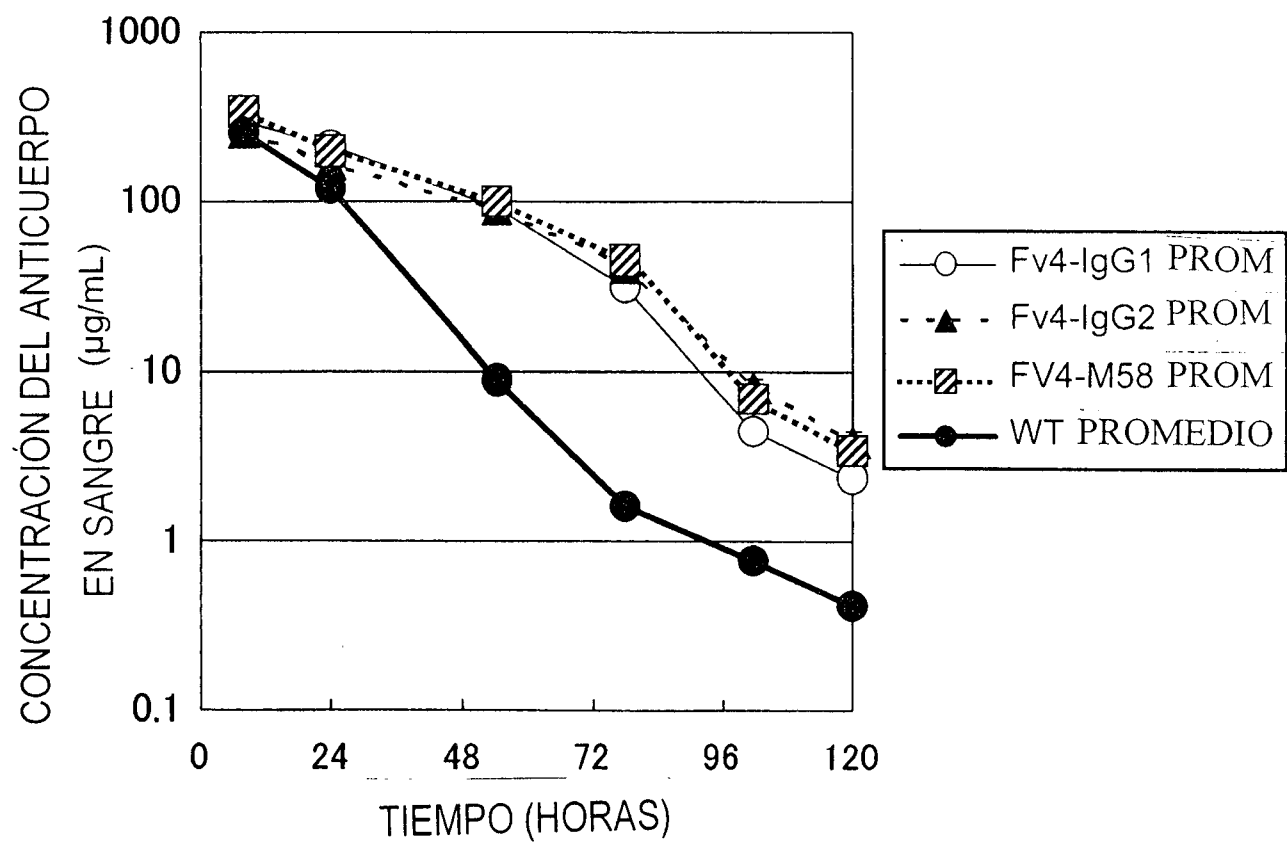


FIG. 20

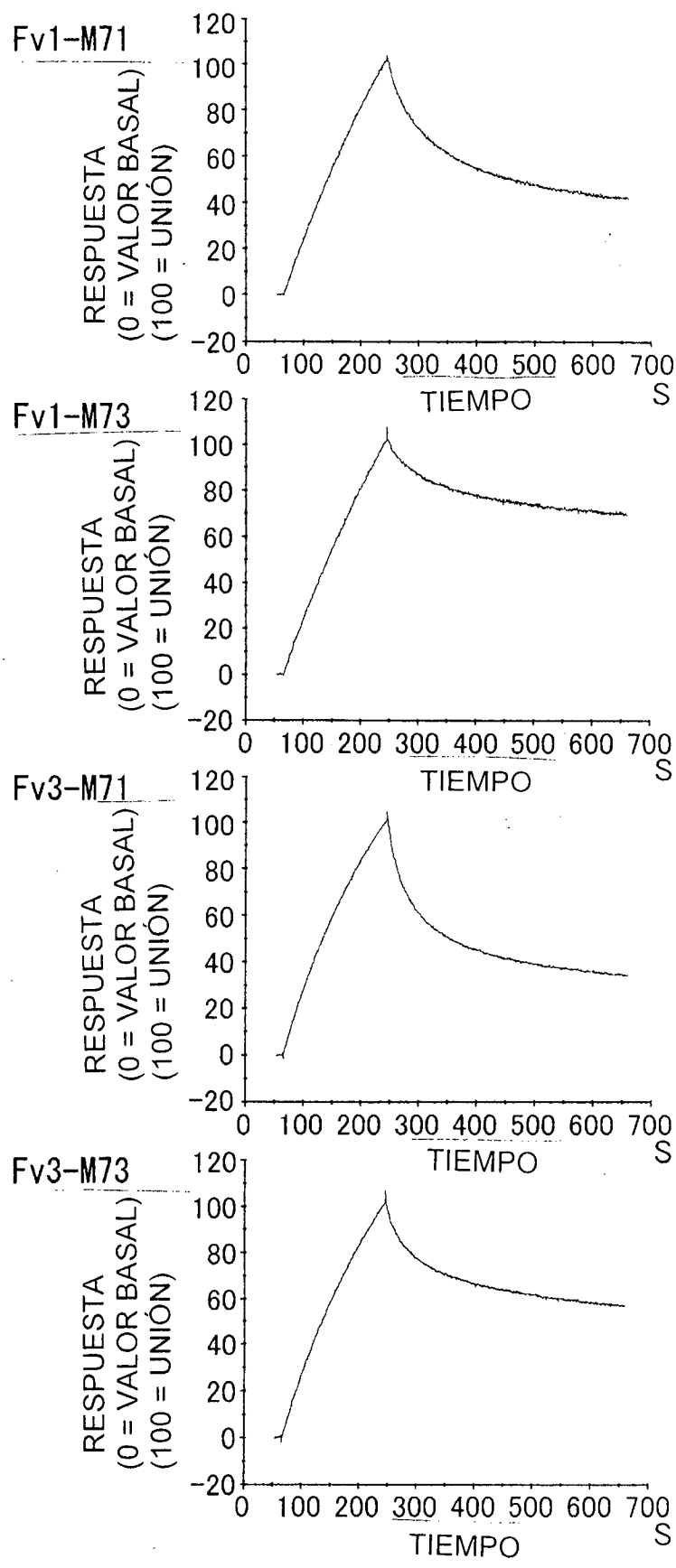


FIG. 21

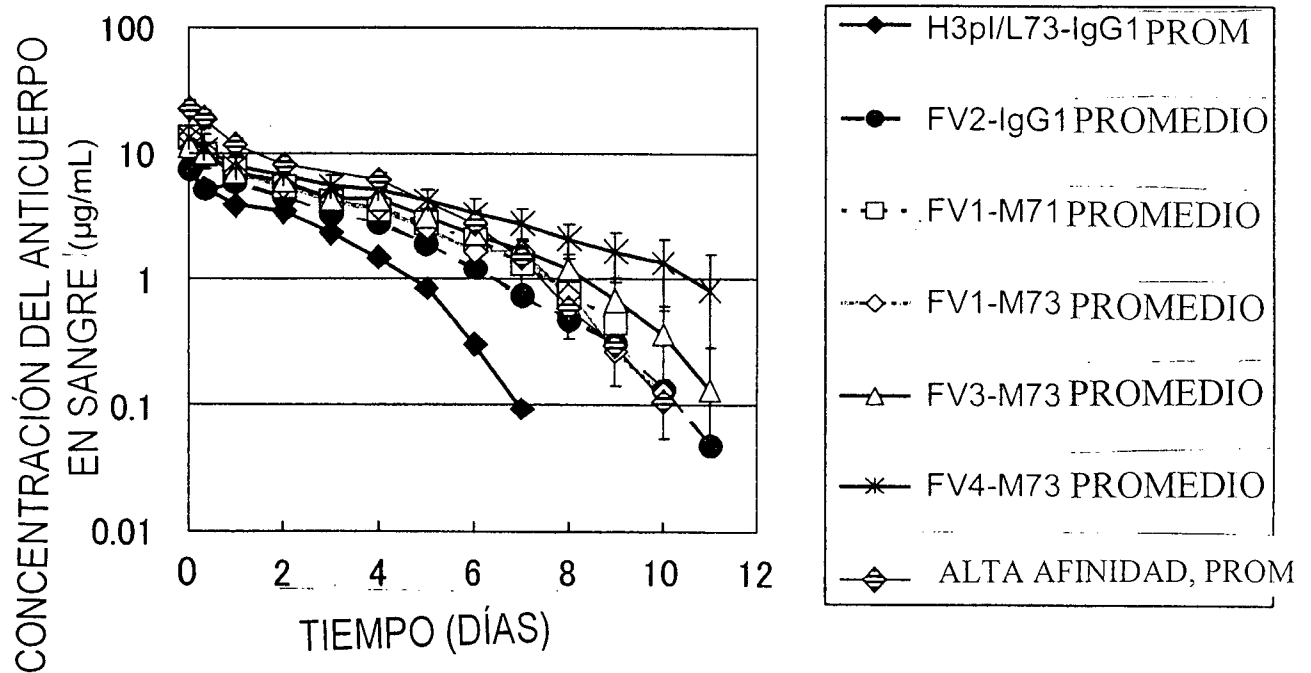


FIG. 22

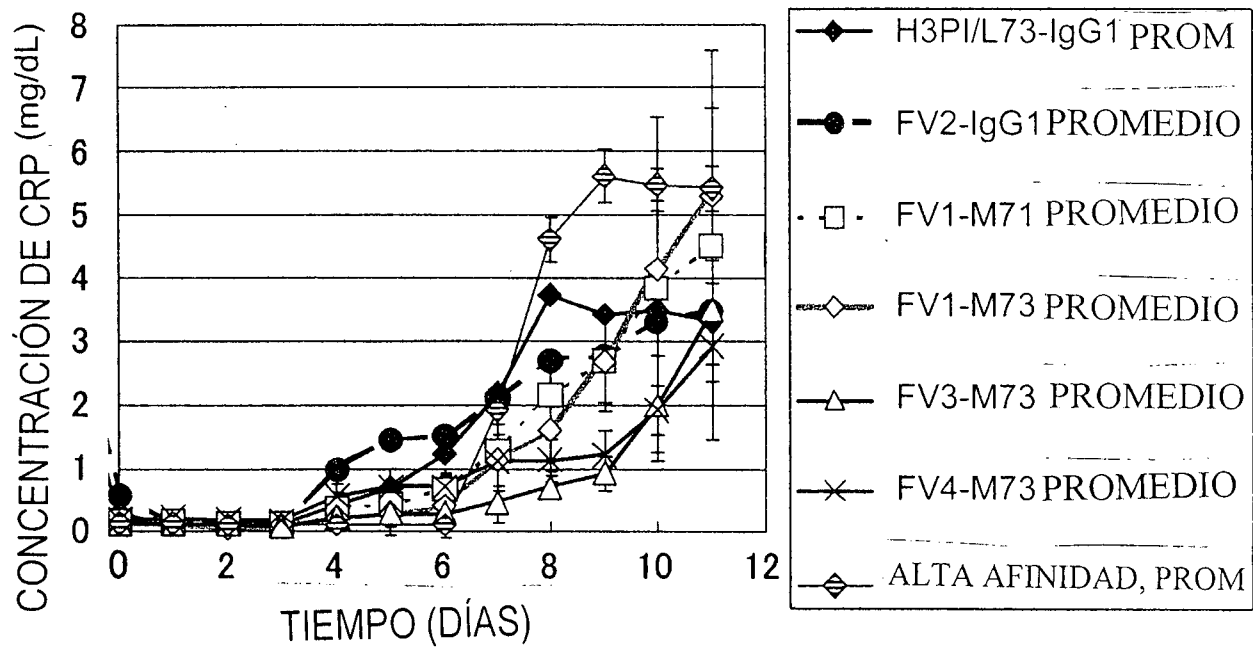


FIG. 23

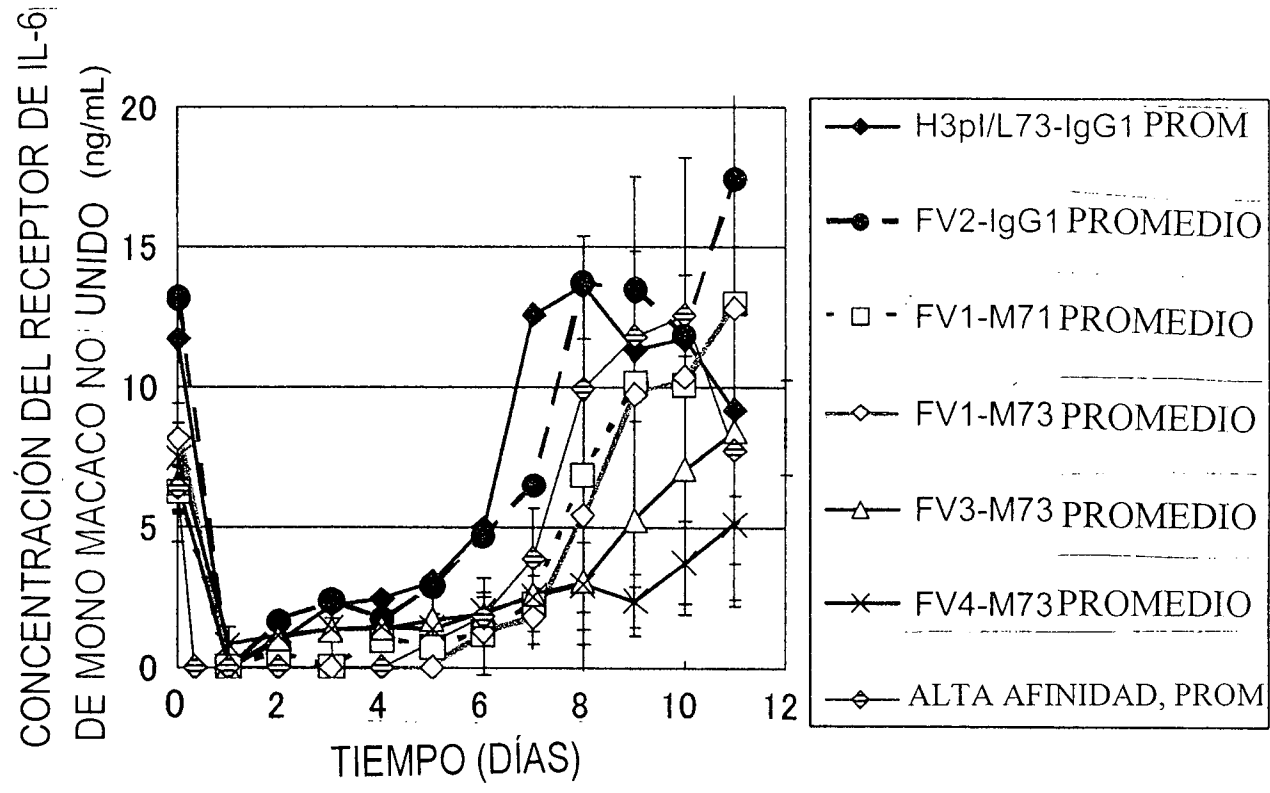


FIG. 24

HEAVY CHAIN									
VH1 :	QVQLQESGPGLVKPS	ETLSLTCAVSGYSIS	HDHAW	WVRQPPGEGLEWIG	HISYSGITNYPHLQD				
VH2 :	QVQLQESGPGLVKPS	ETLSLTCAVSGYSIS	HDHAW	WVRQPPGEGLEWIG	HISYSGITNYPHLQD				
VH3 :	QVQLQESGPGLVKPS	ETLSLTCAVSGHSIS	HDHAW	WVRQPPGEGLEWIG	FISYSGITNYP				
VH4 :	QVQLQESGPGLVKPS	ETLSLTCAVSGHSIS	HDHAW	WVRQPPGEGLEWIG	FISYSGITNYP				
*			* * *						
FR1			CDR1	FR2	CDR2				
VH1 : RVTISRDTSKNQFSLKLS									
VH2 : RVTISRDTSKNQFSLKLS									
VH3 : RVTISRDN									
VH4 : RVTISRDN									
*			* * *						
FR3					CDR3	FR4			
LIGHT CHAIN									
VL1	DIQMTQSPSSLSASVGD	SVTITC	QASRD	ISSHLN	WYQOKPGKAP	ELL IY	YGSHLLS	GVPSRFSGSGSGTD	FTFTISSLEAEDAATYYC
VL2	DIQMTQSPSSLSASVGD	SVTITC	QASRD	ISSHLN	WYQOKPGKAP	ELL IY	YGSHLES	GVPSRFSGSGSGTD	FTFTISSLEAEDAATYYC
VL3	DIQMTQSPSSLSASVGD	SVTITC	QASTD	ISSHLN	WYQOKPGKAP	ELL IY	YGSHLLS	GVPSRFSGSGSGTD	FTFTISSLEAEDAATYYC
*			* * *						
FR1			CDR1	FR2	CDR2				
					GGGNRLPYT		FGQGTKVEIE		
					GGGNRLPYT		FGQGTKVEIE		
					GGGNRLPYT		FGQGTKVEIE		

FIG. 25

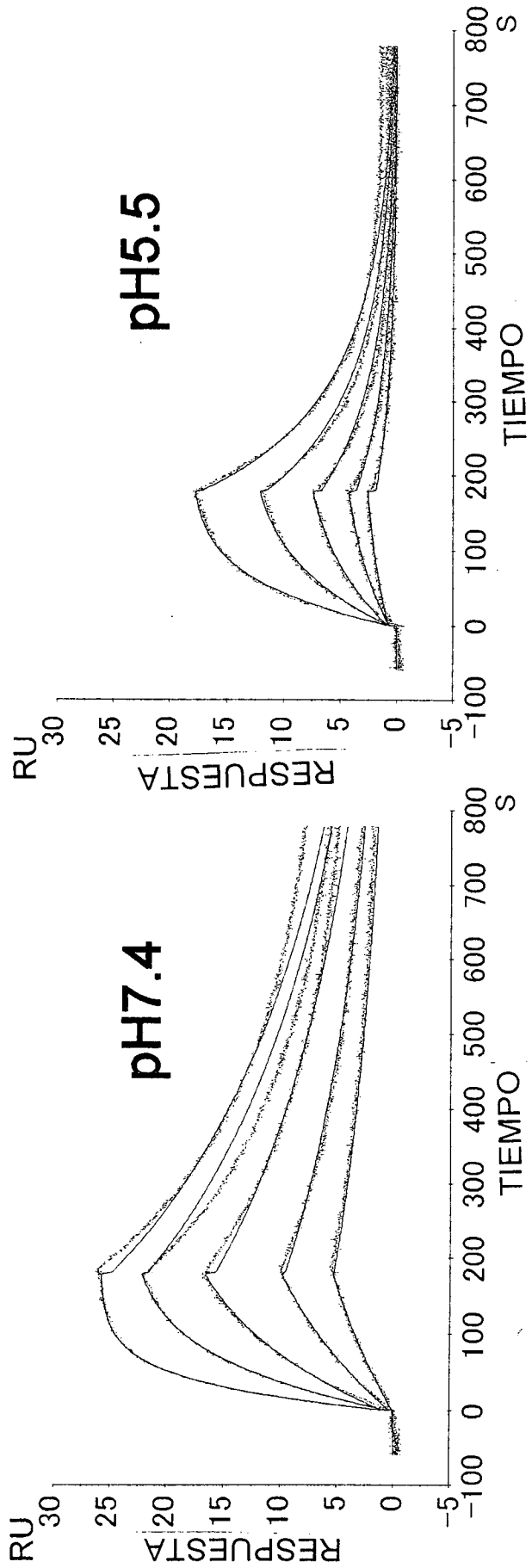


FIG. 26

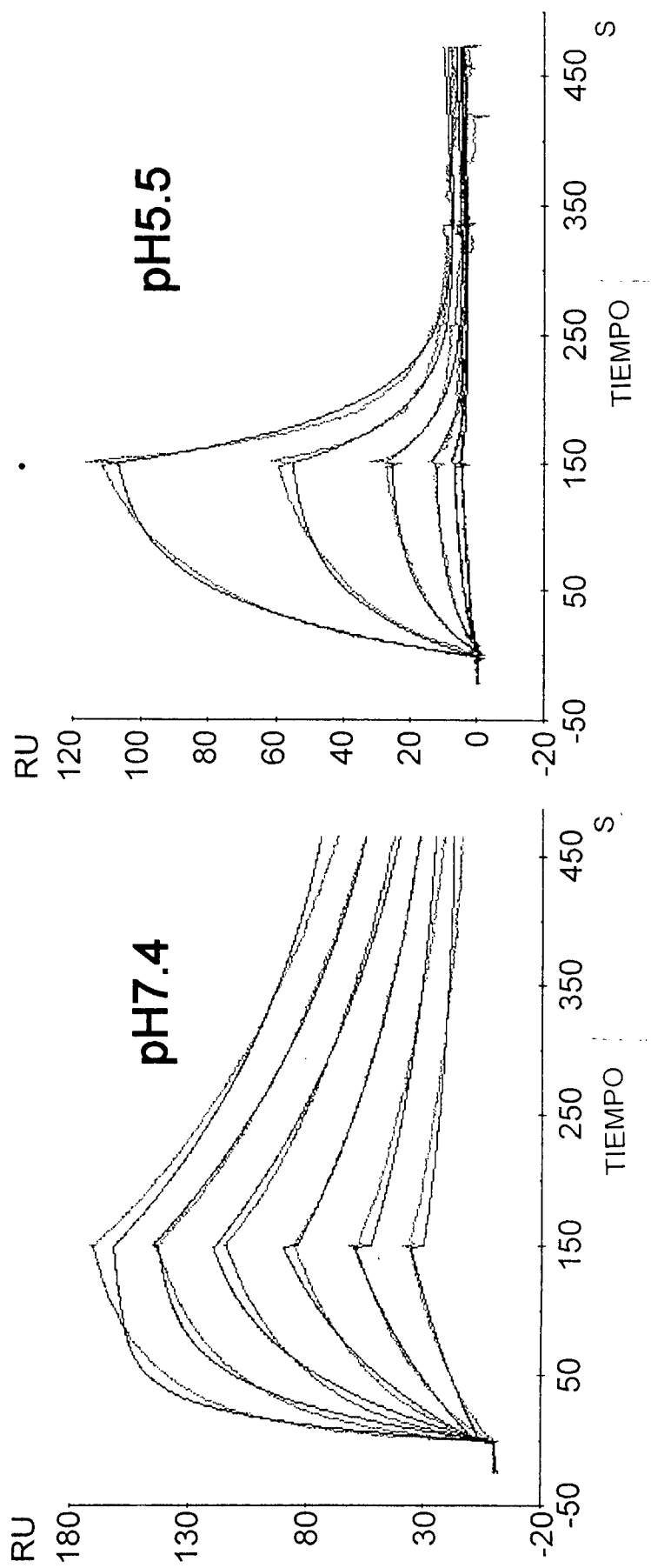


FIG. 27

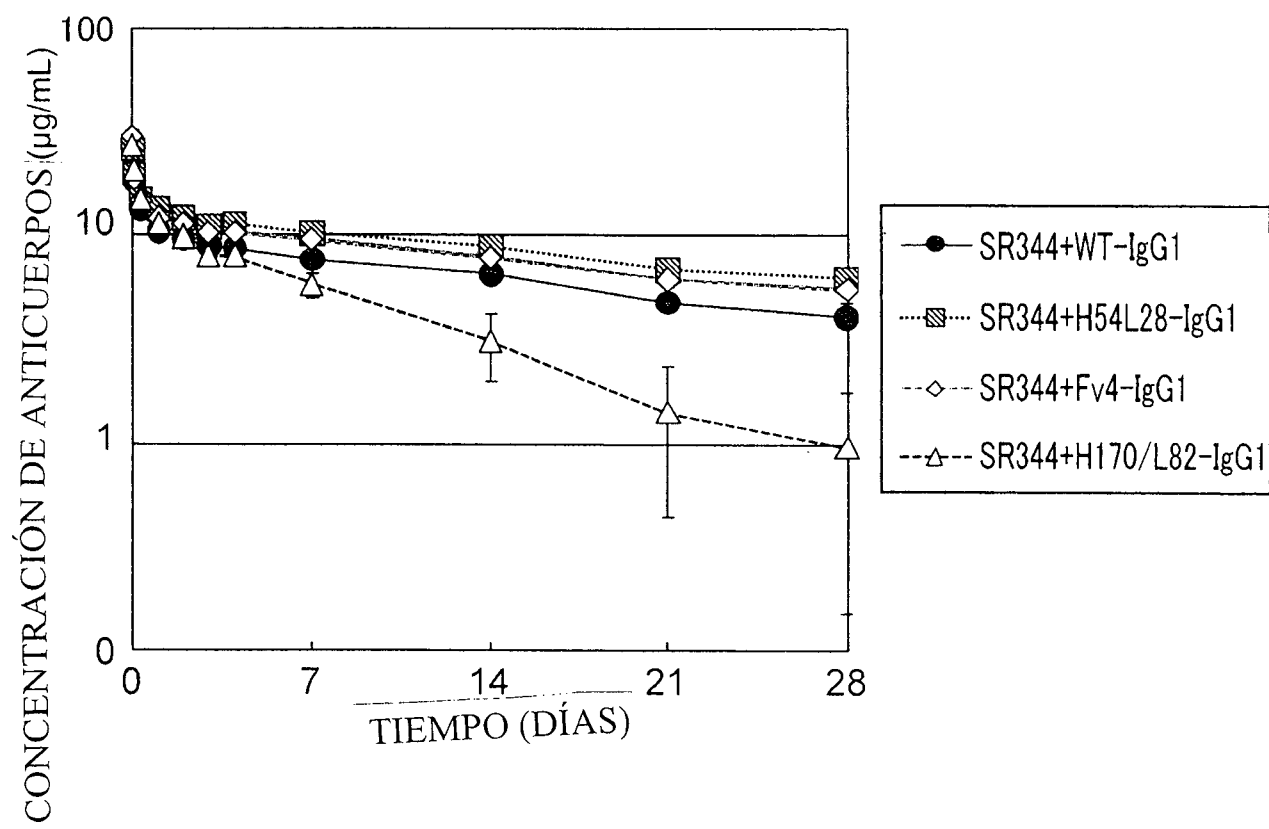


FIG. 28

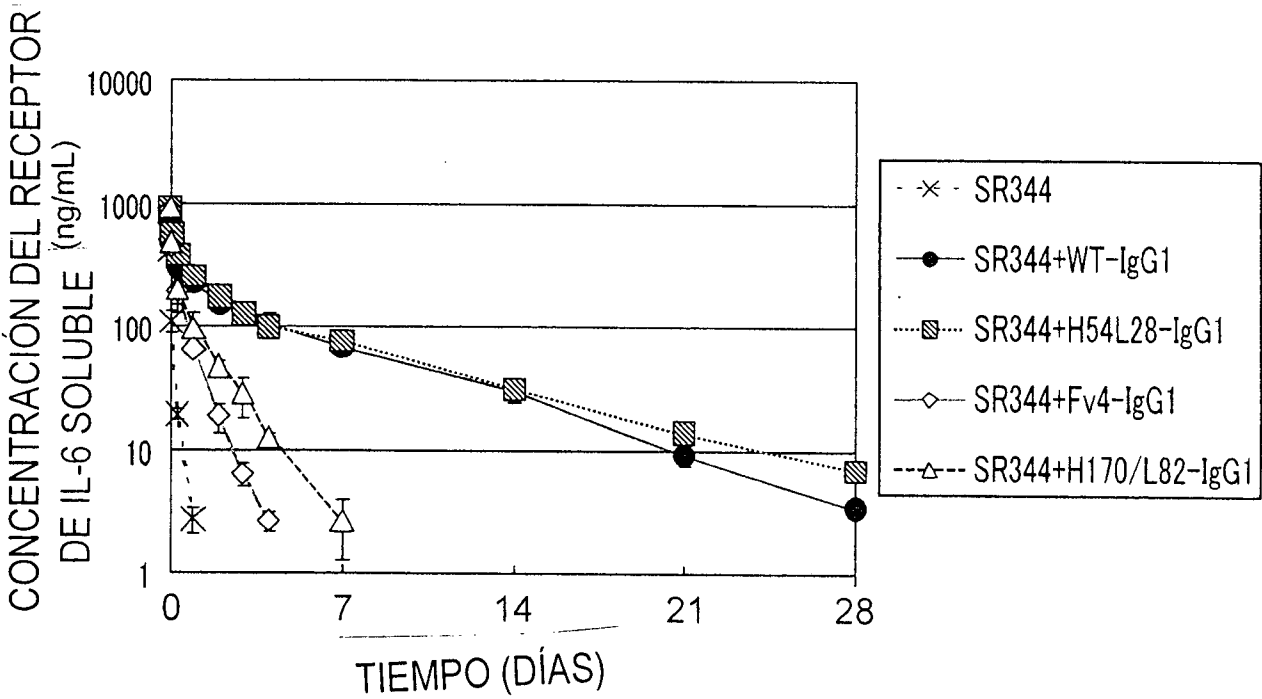


FIG. 29

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> MOLÉCULAS DE UNIÓN AL ANTÍGENO QUE SE UNEN REPETIDAMENTE A MÚLTIPLES
MOLÉCULAS DE ANTÍGENO

<130> C1-A0801Y2-AR

<150> JP 2008-104147

<151> 2008-04-11

<150> JP 2008-247713

<151> 2008-09-26

<150> JP 2009-068744

<151> 2009-03-19

<160> 70

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 1

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

- <210> 2
- <211> 107
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales
- <400> 2

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 Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
85 90 95

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

- <210> 3
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 3

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 His 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

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

Ala Arg Val Leu Ala Arg Ile Thr Ala Met Asp His Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 5

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

Lys Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

204

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

Ala Arg Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 6

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 His 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 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

205

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
100 105

<210> 7
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 7

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 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 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 Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu

100 105

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 8

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 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 His His 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 His Arg Leu Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 9
<211> 448

202

<212> PRT

<213> Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 10

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 10

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 11
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 11

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

His 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 Val Leu Ala Arg Ile Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 12

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

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

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

<210> 13
<211> 1404
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos sintetizada por medios artificiales

<400> 13
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactcccag 60

gtccaactgc aggagagcgg tccaggtctt gtgaaaccta gcgagaccct gagcctgacc 120

tgcgccgtgt ctggctactc aattagcgac gatcatgcct ggagctgggt tcgccagcca 180

cctggagaag gtcttgagtg gattggatac attagttata gtggaatcac aaactataat 240

ccatctctca aaggcagagt gacaatatcg agagacacca gcaagaacca gttcagcctg 300

aaactcagca gcgtgacagc cgccgacacc gcggcttatt attgtgcaag atccctagct 360

cggactacgg ctatggacta ctggggtgaa ggcaccctcg tcacagtctc ctacgcctcc 420

accaagggcc catcggtctt ccccctggca cctctctcca agagcacctc tgggggcaca 480

gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540

tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccggctg tcctacagtc ctacaggactc 600

tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 660

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagtga gcccaaattc 720

tgtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 780

gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc 840

acatgcgtgg tggcggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 900

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 960

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1020

aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaacat ctccaaagcc 1080

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc 1140

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atccagcga catgcccgtg 1200

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260

tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctacacgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320

gggaacgtct tctcatgtc ctgtatgcat gaggctctgc acaaccacta cagcagaag 1380

agcctctccc tgtctcggg taaa 1404

<210> 14

<211> 321

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos sintetizada por medios artificiales

<400> 14

gacatccaga tgaccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagcgtgacc 60

atcacctgtc aagccagcca ggacatcagc agttacctga attggtacca gcagaagcca 120

ggaaaggctc cagagctgct gatctactac ggctccgaac tgcactctgg tgtgccaagc 180

agattcagcg gtagcggtag cggtagcgac ttacattca ccatcagcag cctcgaggca 240

gaggacgccg ctacctacta ctgcgggcag ggtaaccggc ttccatac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcga a 321

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

<220>
<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 15

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
1				5					10					15

<210> 16
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de cebador sintetizado por medios artificiales

<400> 16
ttcccaccag cctgtccgcc tctg 24

<210> 17
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de cebador sintetizado por medios artificiales

<400> 17
cgtgaagcca aaggccccac tccc 24

<210> 18
<211> 32
<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador sintetizado por medios artificiales

<400> 18

tagaattcca ccatgctggc cgtcggctgc gc 32

<210> 19

<211> 57

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de cebador sintetizado por medios artificiales

<400> 19

attgcggccg cttatcagtg gtgatgatga tgatgtgga ccgaagaaga atcttgc 57

<210> 20

<211> 1131

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos sintetizada por medios artificiales

<400> 20

gaattccacc atgctggccg tcggctgcgc gctgctggct gccctgctgg ccgcgccggg 60

ggcggcgctg gccccggggg gctgccctgc acaggaggtg gcgagaggtg tgctgaccag 120

tctgccagga gacagcgtga ctctgacctg cccaggggga gagccggaag acaatgccac 180

tggtcactgg gttctcagga agccagctgt aggtccac ctcagcagat gggctggcgt 240

gggaaggagg ctgctgctga ggtcgggtgca gctccatgac tctggaaact attcatgcta 300

ccgggccggc cggccggctg gaactgtgca cttgctggtg gatgttccc ccgaggagcc 360

ccagctctcc tgctccgga agagccccct cagcaacgtt gtttgtgagt ggggtcctcg 420

gagcacccca tctccgacga ccaaggctgt gctgttggtg aggaagtttc agaacagtcc 480

ggccgaagac ttccaggagc cgtgccagta ttcccaggag tcccagaagt tctcctgcca 540

gttggcagtc ccggagggag acagctottt ctacatagtg tccatgtgcg tcgccagtag 600

tgtcgggagc aagctcagca aaactcagac ctttcagggt tgtggaatct tgcagcctga 660

tccgcctgcc aacatcacag tcaactccgt ggccagaaac ccccgtggc tcaagtgcac 720

ctggcaagac cccactcct ggaactcatc ttctacaga ctacggtttg agctcagata 780

togagctgaa cggtaaaga cattcacaac atggatggtc aaggacctcc agcatcactg 840

tgatcatcac gacgcctgga gcggcctgag gcacgtggtg cagcttcgtg cccaggagga 900

gttcgggcaa ggcgagtgga gcgagtggag cccggaggcc atgggcacgc cttggacaga 960

atccaggagt cctccagctg agaacgaggt gtccaccccc acgcaggcac ctactactaa 1020

taaagatgat gataatattc tctccagaga ttctgcaaat gcgacaagcc tcccagtgca 1080

agattcttct tcggtaccac atcatcatca tcaccactga taagcggccg c 1131

<210> 21

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 21

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

Gln Asp 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 Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His Trp Gly Glu Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu

370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

- <210> 22
- <211> 449
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 22

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr 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 His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu
50 55 60

Gln Asp 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 Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His 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

222

24

210

215

220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

- <210> 23
- <211> 449
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 23

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu

224

26

50

55

60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

- <210> 24
- <211> 449
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 24

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

- <210> 25
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 25

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 Arg 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> 26

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 26

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 Arg 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 Glu 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> 27

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 27

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> 28
<211> 326
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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

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

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

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

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

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

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

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

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

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 29
<211> 324
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 29

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

237

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

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

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

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro

<210> 30

<211> 324

<212> PRT

<213> Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 30

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

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

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

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

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

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

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

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

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

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln 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 Glu 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

- <210> 31
- <211> 326
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 31

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

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

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

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

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

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

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

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

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

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

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

- <210> 32
- <211> 324
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 32

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

243

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

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

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

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

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

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln 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 Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

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

Ser Leu Ser Pro

- <210> 33
- <211> 443
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 33

245

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala 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 Gln
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 Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

247

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 Met 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> 34

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 34

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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro

195

200

205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala 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 Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 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 Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Gln 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 Met 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

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

- <210> 35
- <211> 443
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 35

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

53

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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala 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 Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 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 Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Gln 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 Met 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

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440

- <210> 36
- <211> 445
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 36

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr 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 His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu
50 55 60

Gln Asp 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 Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala 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 Gln
 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 Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Thr 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 Met 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 Ala
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 37
<211> 443
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 37

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr 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 His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu
50 55 60

Gln Asp 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 Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His 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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala 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 Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 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 Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Gln 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 Met 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

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440

<210> 38

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 38

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
 20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala 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 Gln
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 Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

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

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 39

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly His Ser Ile Ser His Asp
20 25 30

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

Ile Gly Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr 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

65

165

170

175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Ser Cys Val Glu
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala 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 Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
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 Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

264

Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 340 345 350

Gln 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 Met 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

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ala
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440

<210> 40

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 40

His Asp His Ala Trp Ser
 1 5

<210> 41

<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 41

His Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro His Leu Gln Asp
1 5 10 15

<210> 42
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 42

Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Gln Gly
1 5 10 15

<210> 43
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 43

Phe Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Thr Leu Gln Gly
1 5 10 15

<210> 44
<211> 10

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 44

Phe Leu Ala Arg Ile Thr Ala His Asp His
1 5 10

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 45

Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 46
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<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 Tyr Ser Ile Ser
 20 25 30

<210> 47

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<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

20

25

30

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 48

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 49

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 49

Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 50

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 50

Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 51

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 51

Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 52

Trp	Gly	Glu	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1				5					10	

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 53

Gln	Ala	Ser	Arg	Asp	Ile	Ser	Ser	His	Leu	Asn
1				5					10	

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 54

Gln	Ala	Ser	Thr	Asp	Ile	Ser	Ser	His	Leu	Asn
1				5					10	

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 55

Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser
1 5

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 56

Tyr Gly Ser His Leu Glu Ser
1 5

<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 57

Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 58

271

<211> 23
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 58

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
20

<210> 59
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 59

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 60
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 61

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu
1 5 10

<210> 62
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 62

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val

75

50

55

60

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

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

Ala Arg Gly Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser 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

274

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 Gly
435 440 445

Lys

<210> 63

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 63

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 64
<211> 449
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 64

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Leu Trp Gly His Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 65

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 65

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Asn His Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Trp Ser Gly His Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 66

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 66

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser His His Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Trp Ser Gly His Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210>	67
<211>	456
<212>	PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 67

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 Gly Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Glu Asp Val Val Pro Ala Ala Met Ser Phe Tyr Tyr Gly Met
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
 450 455

<210> 68

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 68

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Thr Val
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Glu Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr
35 40 45

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

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Thr Asp His
85 90 95

Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly
145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
180 185 190

Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
195 200 205

Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210

<210> 69

<211> 456

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<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 Gly Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Glu Asp Val Val Pro Ala Ala Met Ser Phe Tyr Tyr Gly Met
 100 105 110

Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly
450 455

- <210> 70
- <211> 449
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Secuencia de péptido sintetizada por medios artificiales

<400> 70

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

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

95

420

425

430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2009年10月15日(15.10.2009)



PCT



(10) 国際公開番号

WO 2009/125825 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 16/28 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2009/057309

(22) 国際出願日: 2009年4月10日(10.04.2009)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2008-104147 2008年4月11日(11.04.2008) JP
特願 2008-247713 2008年9月26日(26.09.2008) JP
特願 2009-068744 2009年3月19日(19.03.2009) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社(CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 井川 智之(IGAWA, Tomoyuki) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 石井 慎也(ISHII, Shinya) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 前田 敦彦(MAEDA, Atsuhiko) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 中井 貴士(NAKAI, Takashi) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

(74) 代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て:

— 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則 4.17(ii))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: ANTIGEN-BINDING MOLECULE CAPABLE OF BINDING TO TWO OR MORE ANTIGEN MOLECULES REPEATEDLY

(54) 発明の名称: 複数分子の抗原に繰り返し結合する抗原結合分子

(57) Abstract: It is found that a molecule of an antibody which exhibits a weaker antigen-binding activity at a pH value in an early endosome compared with that at a pH value in a plasma can bind to two or more antigen molecules, and it is also found that the antibody has a long half-life in a plasma and is improved in the period during which the antibody can bind to an antigen.

(57) 要約: 本発明者らは、血漿中での pH における抗原結合活性と比較して早期エンドソーム内での pH における抗原結合活性が弱い抗体は 1 分子の抗体で複数分子の抗原に結合することが可能になり、血漿中半減期が長く、抗原に結合可能な期間が改善されることを見出した。

WO 2009/125825 A1

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
AVAILABILITY OF THE PUBLICATION
OF THE INTERNATIONAL APPLICATION

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F
1-1-1, Oroshi-machi
Tsuchiura-shi, Ibaraki 3000847
JAPONDate of mailing (day/month/year)
15 October 2009 (15.10.2009)Applicant's or agent's file reference
C1-A0801Y2P

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/JP2009/057309International filing date (day/month/year)
10 April 2009 (10.04.2009)Priority date (day/month/year)
11 April 2008 (11.04.2008)

Applicant

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al

The applicant is hereby **notified** that the International Bureau:☒ has **published** the above-indicated international application on 15 October 2009 (15.10.2009) under
No. WO 2009/125825☐ has **republished** the above-indicated international application on under
No. WO
For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48)
or (88) (*as the case may be*) on the front page of the published international application.A copy of the international application is available for viewing and downloading on WIPO's website at the following address:
www.wipo.int/pctdb (in the appropriate field of the structured search, enter the PCT or WO number).The applicant may also obtain a paper copy of the published international application from the International Bureau by sending an e-mail to
patentscope@wipo.int or by submitting a written request to the contact details provided below.The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Yoshiko Kuwahara

Facsimile No. +41 22 338 82 70

e-mail: pt07.pct@wipo.int

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/057309

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K16/28, A61K39/395, C12P21/08, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	ITO, W.et al. The His-probe method: effects of histidine residues introduced into the complementarity-determining regions of antibodies on antigen-antibody interactions at different pH values. FEBS Lett., 1992, Vol.309, No.1, p.85-88	<u>1-8, 28-50</u> 9-27
A	MARTIN, W.L.et al. Crystal Structure at 2.8Å of an FcRn/Heterodimeric Fc Complex: Mechanism of pH-Dependent Binding. Mol.Cell., 2001, Vol.7, p.867-877	1-50

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 April, 2009 (22.04.09)Date of mailing of the international search report
07 July, 2009 (07.07.09)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/057309

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions of claims 1-50 include the following three inventions: an invention relating to an antigen-binding antibody which has a lower binding activity at pH 5.8 than that at pH 7.4 as claimed in claims 1 and 9-14; an invention relating to a method involving the step of substituting an amino acid residue in an antigen-binding molecule by a histidine residue or inserting a histidine residue into the antigen-binding molecule as claimed in claims 18-23; and an invention relating to a method for the screening or production of an antigen-binding molecule having a higher binding activity at a first pH value than that at a second pH value as claimed in claims 28, 30-32 and
(continued to extra sheet)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/057309

Continuation of Box No. III of continuation of first sheet (2)

43-46.

Further, at least the method for producing an antibody having a reduced antigen-binding activity under acidic conditions by inserting a histidine residue is known (see FEBS Lett., 1992, Vol. 309, No. 1, p. 85-88). Therefore, the above-stated three inventions share no common special technical feature, and cannot be regarded as being so linked to one another as to form a single general inventive concept.

特許協力条約

PCT

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第 40、41 条)
〔PCT18 条、PCT 規則 43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 C1-A0801Y2P	今後の手続きについては、様式PCT/ISA/220 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 2009/057309	国際出願日 (日.月.年) 10. 04. 2009	優先日 (日.月.年) 11. 04. 2008
出願人 (氏名又は名称) 中外製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条（PCT18条）の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 5 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語に関し、この国際調査は以下のものに基づき行った。

☒ 出願時の言語による国際出願

☐ 出願時の言語から国際調査のための言語である _____ 語に翻訳された、
この国際出願の翻訳文（PCT規則12.3(a)及び23.1(b)）

b. ☐ この国際調査報告は、PCT規則91の規定により国際調査機関が認めた又は国際調査機関に通知された明らかな誤りの訂正を考慮して作成した（PCT規則43.6の2(a)）。

c. ☒ この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでいる（第Ⅰ欄参照）。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない（第Ⅱ欄参照）。

3. ☒ 発明の単一性が欠如している（第Ⅲ欄参照）。

4. 発明の名称は

☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第Ⅳ欄に示されているように、法施行規則第47条第1項（PCT規則38.2）の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 図面に関して

a. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。

☐ 出願人が示したとおりである。

☐ 出願人は図を示さなかったので、国際調査機関が選択した。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表しているので、国際調査機関が選択した。

b. ☒ 要約とともに公表される図はない。

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

- a. タイプ ☒ 配列表
 ☐ 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット ☐ 紙形式
 ☒ 電子形式
- c. 提出時期 ☒ 出願時の国際出願に含まれていたもの
 ☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの
 ☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

2. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

301

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項1-50に係る発明は、請求項1, 9-14に記載のpH5.8における結合活性がpH7.4における結合活性よりも低い抗原結合分子に関する発明と、請求項18-23に記載の抗原結合分子のアミノ酸をヒスチジンに置換又は挿入することを含む方法に関する発明と、請求項28, 30-32, 43-46に記載の第一のpHでの結合活性が第二のpHでの結合活性よりも高い抗原結合分子のスクリーニング方法又は製造方法に関する発明に係る、3の発明を包含している。

しかも、少なくともヒスチジン残基を導入することによる酸性条件下で抗原に対する結合性が低下した抗体の作製方法が公知（要すれば、FEBS Lett., 1992, Vol. 309, No. 1, p. 85-88を参照）である以上、これらの3の発明は特別な技術的特徴を共有しておらず、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☒ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/28, A61K39/395, C12P21/08, G01N33/15, G01N33/50			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2009年 日本国実用新案登録公報 1996-2009年 日本国登録実用新案公報 1994-2009年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), WPI			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X A	ITO, W. et al. The His-probe method: effects of histidine residues introduced into the complementarity-determining regions of antibodies on antigen-antibody interactions at different pH values. FEBS Lett., 1992, Vol. 309, No. 1, p. 85-88	1-8, 28-50 9-27	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 22.04.2009		国際調査報告の発送日 07.07.2009	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 三原 健治 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 2937

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	MARTIN, W. L. et al. Crystal Structure at 2.8Å of an FcRn/Heterodimeric Fc Complex: Mechanism of pH-Dependent Binding. Mol. Cell., 2001, Vol. 7, p. 867-877	1-50

特許協力条約

REC'D 03 JUL 2009

WIPO PCT

発信人 日本国特許庁（受理官庁）

TO: The International Bureau
of WIPO

34, Chemin des Colombettes
1211 Geneva 20
Switzerland

変更の記録の要請書

〔PCT規則92の2.1〕

発送日（日．月．年）

30.06.2009

国際出願番号

PCT / JP2009 / 057309

国際出願日（日．月．年）

10.04.2009

1. 次の者について以下の情報が現在記録されている。



出願人



発明者



代理人



共通の代表者

氏名（名称）及びあて名

国籍＊

住所＊

電話番号

ファクシミリ番号

電子メールアドレス

2. 受理官庁は、国際事務局に対して次の変更を記録することを要請する。



名義人



氏名（名称）



あて名



国籍＊



住所＊

氏名（名称）及びあて名

国籍＊

住所＊

指定国米国における出願人及びすべての指定国における発明者
中井 貴士
NAKAI Takashi

日本国
Japan

日本国
Japan

電話番号

ファクシミリ番号

電子メールアドレス

☐ 電子メールによる通知の承認

3. 必要な場合の注意

名義変更により追加された。

* 出願人に関する変更の場合に記載する。

受理官庁の名称及びあて名

日本国特許庁（RO/JP）
郵便番号 100-8915 電話番号 03-3592-1308
日本国東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特許庁長官

様式PCT/RO/113（2008年7月）

10.06.2009

名 義 変 更 届

特許庁長官 殿

1. 国際出願の表示 PCT/J P 2009/057309

2. 出 願 人

名 称

中外製薬株式会社

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

あて名

〒115-8543 日本国東京都北区浮間5丁目5番1号

5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115-8543 Japan

国 籍

日本国 Japan

住 所

日本国 Japan

3. 届出の内容 新名義人

事件との関係 米国を除くすべての指定国における出願人

名 称

中外製薬株式会社

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

あて名

〒115-8543 日本国東京都北区浮間5丁目5番1号

5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115-8543 Japan

国 籍

日本国 Japan

住 所

日本国 Japan

事件との関係 指定国米国における出願人及びすべての指定国における
発明者

氏 名

井川 智之 IGAWA, Tomoyuki

あて名

〒412-8513 日本国静岡県御殿場市駒門1丁目135番地

中外製薬株式会社内

c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA,

135, Komakado 1-chome, Gotenba-shi,

Shizuoka 412-8513 Japan

国 籍

日本国 Japan

住 所

日本国 Japan

氏 名 石井 慎也 ISHII, Shinya
あて名 〒412-8513 日本国静岡県御殿場市駒門1丁目135番地
中外製薬株式会社内
c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA,
135, Komakado 1-chome, Gotenba-shi,
Shizuoka 412-8513 Japan
国 籍 日本国 Japan
住 所 日本国 Japan

氏 名 前田 敦彦 MAEDA, Atsuhiko
あて名 〒412-8513 日本国静岡県御殿場市駒門1丁目135番地
中外製薬株式会社内
c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA,
135, Komakado 1-chome, Gotenba-shi,
Shizuoka 412-8513 Japan
国 籍 日本国 Japan
住 所 日本国 Japan

氏 名 中井 貴士 NAKAI, Takashi
あて名 〒412-8513 日本国静岡県御殿場市駒門1丁目135番地
中外製薬株式会社内
c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA,
135, Komakado 1-chome, Gotenba-shi,
Shizuoka 412-8513 Japan
国 籍 日本国 Japan
住 所 日本国 Japan

4. 代 理 人
氏 名

(10297) 弁理士 清水 初志
SHIMIZU, Hatsushi



あて名 〒300-0847 日本国茨城県土浦市御町1-1-1
関鉄つくばビル6階
Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F, 1-1-1, Oroshi-machi,
Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847 Japan

氏 名 (11950) 弁理士 刑部 俊
OSAKABE, Suguru



あて名 〒300-0847 日本国茨城県土浦市卸町1-1-1
関鉄つくばビル6階
Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F, 1-1-1, Oroshi-machi,
Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847 Japan

氏 名 (12804) 弁理士 新見 浩一
SHIMMI, Hirokazu



あて名 〒300-0847 日本国茨城県土浦市卸町1-1-1
関鉄つくばビル6階
Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F, 1-1-1, Oroshi-machi,
Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847 Japan

氏 名 (12950) 弁理士 小林 智彦
KOBAYASHI, Tomohiko



あて名 〒300-0847 日本国茨城県土浦市卸町1-1-1
関鉄つくばビル6階
Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F, 1-1-1, Oroshi-machi,
Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847 Japan

氏 名 (13084) 弁理士 渡邊 伸一
WATANABE, Shinichi



あて名 〒113-0033 日本国東京都文京区本郷5-25-16
石川ビル8階
Ishikawa Bldg. 8F, 5-25-16, Hongo, Bunkyo-ku,
Tokyo 113-0033 Japan

氏 名 (14292) 弁理士 井上 隆一
INOUE, Ryuichi



あて名 〒300-0847 日本国茨城県土浦市卸町1-1-1
関鉄つくばビル6階
Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F, 1-1-1, Oroshi-machi,
Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847 Japan

氏 名 (13084) 弁理士 大関 雅人
OHZEKI, Masato



あて名 〒113-0033 日本国東京都文京区本郷5-25-16
石川ビル8階
Ishikawa Bldg. 8F, 5-25-16, Hongo, Bunkyo-ku,
Tokyo 113-0033 Japan

5. 添付書類の目録 (1) 代理権を証明する書面

1 通

委任状

平成 21 年 6 月 5 日

我々は、弁理士 清水初志（10297）、弁理士 刑部 俊（11950）、
弁理士 新見浩一（12804）、弁理士 小林智彦（12950）、弁理士 渡
邊伸一（13084）、弁理士 井上隆一（14292）、弁理士 大関雅人（1
1434）を代理人と定めて下記の権限を委任します。

1. 特許協力条約に基づく国際出願PCT/JP2009/057309に関する一切の件
2. 上記出願及び指定国の指定を取り下げる件
3. 上記出願についての国際予備審査の請求に関する一切の件並びに請求及び選
択国の選択を取り下げる件

あて名 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地

中外製薬株式会社内

氏 名 中井 貴士



PATENT COOPERATION TREATY

PCT/JP2009/057309

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F
1-1-1, Oroshi-machi
Tsuchiura-shi, Ibaraki 3000847
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 16 June 2009 (16.06.2009)	
Applicant's or agent's file reference C1-A0801Y2P	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP2009/057309	International filing date (day/month/year) 10 April 2009 (10.04.2009)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 11 April 2008 (11.04.2008)
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al	

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable)* The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable)* An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
11 April 2008 (11.04.2008)	2008-104147	JP	04 June 2009 (04.06.2009)
26 September 2008 (26.09.2008)	2008-247713	JP	04 June 2009 (04.06.2009)
19 March 2009 (19.03.2009)	2009-068744	JP	04 June 2009 (04.06.2009)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Yoshiko Kuwahara e-mail PT07.PCT@WIPO.INT Telephone No. +41 22 338 74 07
Facsimile No. +41 22 338 82 70	

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F
1-1-1, Oroshi-machi
Tsuchiura-shi, Ibaraki 3000847
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 28 May 2009 (28.05.2009)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference C1-A0801Y2P	International application No. PCT/JP2009/057309

The applicant is hereby **notified** that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (for all designated States except US)
IGAWA, Tomoyuki et al (for US)

International filing date:	10 April 2009 (10.04.2009)
Priority date(s) claimed:	11 April 2008 (11.04.2008) 26 September 2008 (26.09.2008) 19 March 2009 (19.03.2009)
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:	23 April 2009 (23.04.2009)

List of designated Offices:

AP: BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW
EA: AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM
EP: AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR
OA: BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
National: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

ATTENTION: The applicant should carefully check the data appearing in this notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau. **In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:**

- time limits for entry into the national phase - **see updated important information (as of April 2002)**
- requirements regarding priority documents (if applicable)

A copy of this notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Roux Marianne e-mail pt07.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 07
Facsimile No. +41 22 338 90 90	

312

INFORMATION ON ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the **"national phase" must be entered** before each of the designated Offices indicated on the cover sheet of this notification by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by Articles 22 and 39 and the applicable national laws. In addition, the applicant may also have to comply with **other special requirements** applicable in certain Offices. It is the **applicant's responsibility** to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

The **applicable time limit** for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph**, be **30 MONTHS** from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of 19 months from the priority date (see Article 39(1)), but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of that designated Office. For further details, see *PCT Gazette* No. 44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the *PCT Newsletter*, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, **time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time**, in respect of certain designated or elected Offices. For **regular updates on the applicable time limits (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit)**, Office by Office, refer to the *PCT Gazette* ("Section IV" part published on a weekly basis), to the *PCT Newsletter* (on a monthly basis) and to the relevant National Chapters in Volume II of the *PCT Applicant's Guide* (the paper version of which is updated usually twice a year and the Internet version of which is updated usually on a weekly basis). Finally, a cumulative table of all applicable time limits for entering the national phase is available from WIPO's Internet site, via links from various pages of the site, including those of the *Gazette*, *Newsletter* and *Guide*, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

Information about the requirements for **filing a demand for international preliminary examination** is set out in the *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Chapter IX. Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II).

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before the date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau and if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances (Rule 17.1(c)).

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit (and all other PCT time limits) is the filing date of the earliest application whose priority is claimed (Article 2(xi)(b)).

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2009/125825
PCT/JP2009/057309

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

SECOND AND SUPPLEMENTARY NOTICE
INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES
WHICH APPLY THE 30 MONTH TIME
LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F
1-1-1, Oroshi-machi
Tsuchiura-shi, Ibaraki 3000847
JAPON

Date of mailing (day/month/year)
12 August 2010 (12.08.2010)

Applicant's or agent's file reference
C1-A0801Y2P

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/JP2009/057309

International filing date (day/month/year)
10 April 2009 (10.04.2009)

Priority date (day/month/year)
11 April 2008 (11.04.2008)

Applicant

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al

1. **ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does not apply**, please see Form PCT/IB/308(First Notice) issued previously.

2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
15 October 2009 (15.10.2009)

AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EP, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MY, MZ, NA, NG, PG, RU, SY, TM, US

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1 :

AE, AG, AL, AM, AO, AP, AT, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BZ, CA, CH, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KM, KN, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LY, MA, ME, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PH, PL, PT, RO, RS, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, TJ, TN, TR, TT, UA, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated or elected Office(s) listed above, the applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph**, be **30 MONTHS** from the priority date.

In practice, **time limits other than the 30-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated or elected Office(s) listed above. For **regular updates on the applicable time limits** (30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's **sole responsibility** to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Yoshiko Kuwahara

Facsimile No. +41 22 338 82 70

e-mail: pt07.pct@wipo.int

314

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2009/125825
PCT/JP2009/057309

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

SECOND AND SUPPLEMENTARY NOTICE
INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES
WHICH APPLY THE 30 MONTH TIME
LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F
1-1-1, Oroshi-machi
Tsuchiura-shi, Ibaraki 3000847
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 12 August 2010 (12.08.2010)		
Applicant's or agent's file reference C1-A0801Y2P		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/JP2009/057309	International filing date (day/month/year) 10 April 2009 (10.04.2009)	Priority date (day/month/year) 11 April 2008 (11.04.2008)
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al		

1. **ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does not apply**, please see Form PCT/IB/308(First Notice) issued previously.

2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
15 October 2009 (15.10.2009)

AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EP, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MY, MZ, NA, NG, PG, RU, SY, TM, US

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1 :

AE, AG, AL, AM, AO, AP, AT, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BZ, CA, CH, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KM, KN, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LY, MA, ME, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PH, PL, PT, RO, RS, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, TJ, TN, TR, TT, UA, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated or elected Office(s) listed above, the applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph**, be **30 MONTHS** from the priority date.

In practice, **time limits other than the 30-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated or elected Office(s) listed above. For **regular updates on the applicable time limits** (30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's **sole responsibility** to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Yoshiko Kuwahara
Facsimile No. +41 22 338 82 70	e-mail: pt07.pct@wipo.int

315

PCT

紙面による写し(注意 提出用では有りません)

VIII-2-1	出願し及び特許を与えられる国際出願日における出願人の資格に関する申立て 出願し及び特許を与えられる国際出願日における出願人の資格に関する申立て (本申立てが規則4.17(iv)に規定する申立てに該当しない場合)(規則4.17(ii)及び51の2.1(a)(ii)) 氏名(姓名)	本国際出願 に関し、 以下の事実により、 中外製薬株式会社 CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHAは、 出願し及び特許を与えられる資格を有している。
VIII-2-1(ii)		中外製薬株式会社 CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA は、発明者たる 井川 智之 IGAWA, Tomoyuki の雇用者としての資格を有している。
VIII-2-1(ii)		中外製薬株式会社 CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA は、発明者たる 石井 慎也 ISHII, Shinya の雇用者としての資格を有している。
VIII-2-1(ii)		中外製薬株式会社 CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA は、発明者たる 前田 敦彦 MAEDA, Atsuhiko の雇用者としての資格を有している。

特許協力条約に基づく国際出願願書

紙面による写し (注意 電子データが原本となります)

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	PCT/JP2009/057309
0-2	国際出願日	2009年 04月 10日 (10. 04. 2009)
0-3	(受付印)	
0-4	様式 PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、	
0-4-1	右記によって作成された。	JPO-PAS 0361
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	C1-A0801Y2P
I	発明の名称	複数分子の抗原に繰り返し結合する抗原結合分子
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除く全ての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	中外製薬株式会社
II-4en	Name:	CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
II-5ja	あて名	1158543 日本国 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号
II-5en	Address:	5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 1158543 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
II-11	出願人登録番号	000003311

特許協力条約に基づく国際出願願書

紙面による写し (注意 電子データが原本となります)

III-1	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only) 井川 智之 IGAWA, Tomoyuki 4128513 日本国 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式 会社内 c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, 135, Komaka do 1-chome, Gotenba-shi, Shizuoka 4128513 Japan 日本国 JP 日本国 JP
III-1-1	この欄に記載した者は	
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	
III-1-4ja	氏名(姓名)	
III-1-4en	Name (LAST, First):	
III-1-5ja	あて名	
III-1-5en	Address:	
III-1-6	国籍(国名)	
III-1-7	住所(国名)	
III-2	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only) 石井 慎也 ISHII, Shinya 4128513 日本国 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式 会社内 c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, 135, Komaka do 1-chome, Gotenba-shi, Shizuoka 4128513 Japan 日本国 JP 日本国 JP
III-2-1	この欄に記載した者は	
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	
III-2-4ja	氏名(姓名)	
III-2-4en	Name (LAST, First):	
III-2-5ja	あて名	
III-2-5en	Address:	
III-2-6	国籍(国名)	
III-2-7	住所(国名)	

特許協力条約に基づく国際出願願書

紙面による写し (注意 電子データが原本となります)

III-3	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only) 前田 敦彦 MAEDA, Atsuhiko 4128513 日本国 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式 会社内 c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, 135, Komaka do 1-chome, Gotenba-shi, Shizuoka 4128513 Japan 日本国 JP 日本国 JP
III-3-1	この欄に記載した者は	
III-3-2	右の指定国についての出願人である。	
III-3-4ja	氏名(姓名)	
III-3-4en	Name (LAST, First):	
III-3-5ja	あて名	
III-3-5en	Address:	
III-3-6	国籍(国名)	
III-3-7	住所(国名)	
IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右 記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent) 清水 初志 SHIMIZU, Hatsushi 3000847 日本国 茨城県土浦市卸町 1 - 1 - 1 関鉄つくばビル 6 階 Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F, 1-1-1, Oroshi-machi, Tsuchiura-shi, Ibaraki 3000847 Japan 029-841-2001 029-841-2009 100102978
IV-1-1ja	氏名(姓名)	
IV-1-1en	Name (LAST, First):	
IV-1-2ja	あて名	
IV-1-2en	Address:	
IV-1-3	電話番号	
IV-1-4	ファクシミリ番号	
IV-1-6	代理人登録番号	
IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with the same address as first named agent) 刑部 俊 (100119507); 新見 浩一 (100128048); 小林 智彦 (100129506); 井上 隆一 (100142929) OSAKABE, Suguru (100119507); SHIMMI, Hirokazu (100128048); KOBAYASHI, Tomohiko (100129506); INOUE, Ryuichi (100142929)
IV-2-1ja	氏名	
IV-2-1en	Name(s)	

特許協力条約に基づく国際出願願書

紙面による写し(注意 電子データが原本となります)

IV-3	その他の代理人	代理人 (agent)
IV-3-1ja	氏名(姓名)	渡邊 伸一
IV-3-1en	Name (LAST, First):	WATANABE, Shinichi
IV-3-2ja	あて名	1130033 日本国
IV-3-2en	Address:	東京都文京区本郷 5-25-16 石川ビル 8階 Ishikawa Bldg. 8F, 5-25-16, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 1130033 Japan
IV-3-3	電話番号	
IV-3-4	ファクシミリ番号	
IV-3-5	電子メール	
IV-3-6	代理人登録番号	100130845
IV-4	その他の代理人	代理人 (agent)
IV-4-1ja	氏名(姓名)	大関 雅人
IV-4-1en	Name (LAST, First):	OHZEKI, Masato
IV-4-2ja	あて名	1130033 日本国
IV-4-2en	Address:	東京都文京区本郷 5-25-16 石川ビル 8階 Ishikawa Bldg. 8F, 5-25-16, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 1130033 Japan
IV-4-3	電話番号	
IV-4-4	ファクシミリ番号	
IV-4-5	電子メール	
IV-4-6	代理人登録番号	100114340
V	国の指定	
V-1	この願書を用いてされた国際出願は、規則 4.9(a)に基づき、国際出願の時点で拘束される全てのPCT締約国を指定し、取得しうるあらゆる種類の保護を求め、及び該当する場合には広域と国内特許の両方を求める国際出願となる。	
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張	
VI-1-1	出願日	2008年 04月 11日 (11. 04. 2008)
VI-1-2	出願番号	2008-104147
VI-1-3	国名	日本国 JP
VI-2	先の国内出願に基づく優先権主張	
VI-2-1	出願日	2008年 09月 26日 (26. 09. 2008)
VI-2-2	出願番号	2008-247713
VI-2-3	国名	日本国 JP
VI-3	先の国内出願に基づく優先権主張	
VI-3-1	出願日	2009年 03月 19日 (19. 03. 2009)
VI-3-2	出願番号	2009-068744
VI-3-3	国名	日本国 JP
VII-1	特定された国際調査機関(ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2009/125825
PCT/JP2009/057309

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

FIRST NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF
THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH
DO NOT APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT
UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

SHIMIZU, Hatsushi
Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F
1-1-1, Oroshi-machi
Tsuchiura-shi, Ibaraki 3000847
JAPON

Date of mailing (day/month/year)
12 November 2009 (12.11.2009)

Applicant's or agent's file reference
C1-A0801Y2P

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/JP2009/057309

International filing date (day/month/year)
10 April 2009 (10.04.2009)

Priority date (day/month/year)
11 April 2008 (11.04.2008)

Applicant

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al

- ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does apply**, please see Form PCT/IB/308(Second and Supplementary Notice) (to be issued promptly after the expiration of 28 months from the priority date).
- Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does not apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
15 October 2009 (15.10.2009)

None

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

- The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does not apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1 :

LU, TZ, UG

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated Office(s) listed above, and unless a demand for international preliminary examination has been filed before the expiration of **19 months** from the priority date (see Article 39(1)), the applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph**, be **20 MONTHS** from the priority date.

In practice, **time limits other than the 20-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated Offices listed above. For **regular updates on the applicable time limits** (20 or 21 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's **sole responsibility** to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Yoshiko Kuwahara

Facsimile No. +41 22 338 82 70

e-mail: pt07.pct@wipo.int

321

特許協力条約に基づく国際出願願書

紙面による写し (注意 電子データが原本となります)

VIII	申立て	申立て数	
VIII-1	発明者の特定に関する申立て	-	
VIII-2	出願し及び特許を与えられる国際出願日における出願人の資格に関する申立て	1	
VIII-3	先の出願の優先権を主張する国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-4	発明者である旨の申立て (米国を指定国とする場合)	-	
VIII-5	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て	-	

特許協力条約に基づく国際出願願書

紙面による写し(注意 電子データが原本となります)

VIII-2-1	出願し及び特許を与えられる国際出願日における出願人の資格に関する申立て 出願し及び特許を与えられる国際出願日における出願人の資格に関する申立て (本申立てが規則4.17(iv)に規定する申立てに該当しない場合)(規則4.17(ii)及び51の2.1(a)(ii)) 氏名(姓名)	本国際出願 に関し、 以下の事実により、 中外製薬株式会社 CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHAは、 出願し及び特許を与えられる資格を有している。
VIII-2-1(ii)		中外製薬株式会社 CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA は、発明者たる井川 智之 IGAWA, Tomoyuki の雇用者としての資格を有している。
VIII-2-1(ii)		中外製薬株式会社 CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA は、発明者たる石井 慎也 ISHII, Shinya の雇用者としての資格を有している。
VIII-2-1(ii)		中外製薬株式会社 CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA は、発明者たる前田 敦彦 MAEDA, Atsuhiko の雇用者としての資格を有している。

特許協力条約に基づく国際出願願書

紙面による写し (注意 電子データが原本となります)

IX	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
IX-1	願書(申立てを含む)	8	✓
IX-2	明細書 (配列表または配列表に関連するテーブルを除く)	129	✓
IX-3	請求の範囲	6	✓
IX-4	要約	1	✓
IX-5	図面	21	✓
IX-7a	国際出願に含まれる用紙の枚数(明細書の配列表を除く)	165	
IX-6a	明細書の配列表	85	✓
IX-7	合計	250	
	添付書類	添付	添付された電子データ
IX-8	手数料計算用紙	-	✓
IX-18	PCT-SAFE 電子出願	-	-
IX-20	要約とともに提示する図の番号		
IX-21	国際出願の使用言語名	日本語	
X-1	出願人、代理人又は代表者の記名押印	/100102978/	
X-1-1	氏名(姓名)	清水 初志	
X-1-2	署名者の氏名		
X-1-3	権限		
X-2	出願人、代理人又は代表者の記名押印	/100119507/	
X-2-1	氏名(姓名)	刑部 俊	
X-2-2	署名者の氏名		
X-2-3	権限		
X-3	出願人、代理人又は代表者の記名押印	/100128048/	
X-3-1	氏名(姓名)	新見 浩一	
X-3-2	署名者の氏名		
X-3-3	権限		
X-4	出願人、代理人又は代表者の記名押印	/100129506/	
X-4-1	氏名(姓名)	小林 智彦	
X-4-2	署名者の氏名		
X-4-3	権限		
X-5	出願人、代理人又は代表者の記名押印	/100142929/	
X-5-1	氏名(姓名)	井上 隆一	
X-5-2	署名者の氏名		
X-5-3	権限		

特許協力条約に基づく国際出願願書

紙面による写し(注意 電子データが原本となります)

X-6	出願人、代理人又は代表者の記名押印	/100130845/
X-6-1	氏名(姓名)	渡邊 伸一
X-6-2	署名者の氏名	
X-6-3	権限	
X-7	出願人、代理人又は代表者の記名押印	/100114340/
X-7-1	氏名(姓名)	大関 雅人
X-7-2	署名者の氏名	
X-7-3	権限	

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類 の実際の受理の日	2009年 04月 10日 (10. 04. 2009)
10-2	図面	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類 を補完する書類又は図面であつ てその後期間内に提出されたも のの実際の受理の日(訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づ く必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際 調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

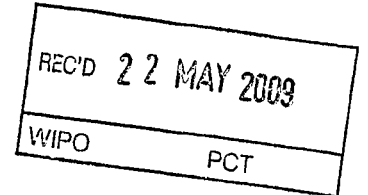
11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

20.04.2009

優先権書類送付請求書

特許庁長官殿

1. 国際出願の表示 PCT/J P 2009/057309



2. 優先権の主張となる出願の表示 特願2008-104147、
 特願2008-247713、
 特願2009-068744

3. 出願人

名 称 中外製薬株式会社
 CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
 あて名 〒115-8543 日本国東京都北区浮間5丁目5番1号
 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115-8543 Japan
 国 籍 日本国 Japan
 住 所 日本国 Japan

4. 代理人

氏 名 弁理士 清水 初志
 SHIMIZU Hatsushi
 あて名 〒300-0847 日本国茨城県土浦市御町1-1-1
 関鉄つくばビル6階
 Kantetsu Tsukuba Bldg. 6F, 1-1-1, Oroshi-machi,
 Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0847 JAPAN



5. 添付書類の目録

特願2008-104147の優先権証明願	1 通
特願2008-247713の優先権証明願	1 通
特願2009-068744の優先権証明願	1 通

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/057309

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K16/28, A61K39/395, C12P21/08, G01N33/15, G01N33/50 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), WPI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	ITO, W.et al. The His-probe method: effects of histidine residues introduced into the complementarity-determining regions of antibodies on antigen-antibody interactions at different pH values. FEBS Lett., 1992, Vol.309, No.1, p.85-88	<u>1-8,28-50</u> 9-27
A	MARTIN, W.L.et al. Crystal Structure at 2.8Å of an FcRn/Heterodimeric Fc Complex: Mechanism of pH-Dependent Binding. Mol.Cell., 2001, Vol.7, p.867-877	1-50
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 April, 2009 (22.04.09)		Date of mailing of the international search report 07 July, 2009 (07.07.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/057309

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions of claims 1-50 include the following three inventions: an invention relating to an antigen-binding antibody which has a lower binding activity at pH 5.8 than that at pH 7.4 as claimed in claims 1 and 9-14; an invention relating to a method involving the step of substituting an amino acid residue in an antigen-binding molecule by a histidine residue or inserting a histidine residue into the antigen-binding molecule as claimed in claims 18-23; and an invention relating to a method for the screening or production of an antigen-binding molecule having a higher binding activity at a first pH value than that at a second pH value as claimed in claims 28, 30-32 and
(continued to extra sheet)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/057309

Continuation of Box No. III of continuation of first sheet (2)

43-46.

Further, at least the method for producing an antibody having a reduced antigen-binding activity under acidic conditions by inserting a histidine residue is known (see FEBS Lett., 1992, Vol. 309, No. 1, p. 85-88). Therefore, the above-stated three inventions share no common special technical feature, and cannot be regarded as being so linked to one another as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/28 (2006.01)i, A61K39/395 (2006.01)i, C12P21/08 (2006.01)i, G01N33/15 (2006.01)i, G01N33/50 (2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/28, A61K39/395, C12P21/08, G01N33/15, G01N33/50			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2009年 日本国実用新案登録公報 1996-2009年 日本国登録実用新案公報 1994-2009年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), WPI			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X A	ITO, W. et al. The His-probe method: effects of histidine residues introduced into the complementarity-determining regions of antibodies on antigen-antibody interactions at different pH values. FEBS Lett., 1992, Vol. 309, No. 1, p. 85-88	1-8, 28-50 9-27	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 22.04.2009		国際調査報告の発送日 07.07.2009	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 三原 健治 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 2937

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	MARTIN, W. L. et al. Crystal Structure at 2.8Å of an FcRn/Heterodimeric Fc Complex: Mechanism of pH-Dependent Binding. Mol. Cell., 2001, Vol. 7, p. 867-877	1-50

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項1－50に係る発明は、請求項1，9－14に記載のpH5.8における結合活性がpH7.4における結合活性よりも低い抗原結合分子に関する発明と、請求項18－23に記載の抗原結合分子のアミノ酸をヒスチジンに置換又は挿入することを含む方法に関する発明と、請求項28，30－32，43－46に記載の第一のpHでの結合活性が第二のpHでの結合活性よりも高い抗原結合分子のスクリーニング方法又は製造方法に関する発明に係る、3の発明を包含している。

しかも、少なくともヒスチジン残基を導入することによる酸性条件下で抗原に対する結合性が低下した抗体の作製方法が公知（要すれば、FEBS Lett., 1992, Vol. 309, No. 1, p. 85-88を参照）である以上、これらの3の発明は特別な技術的特徴を共有しておらず、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

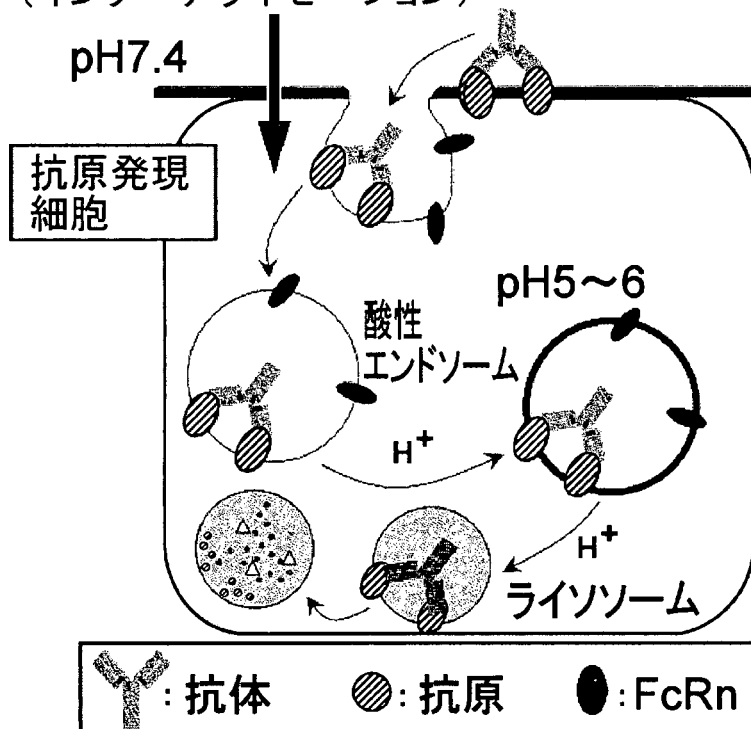
追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☒ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

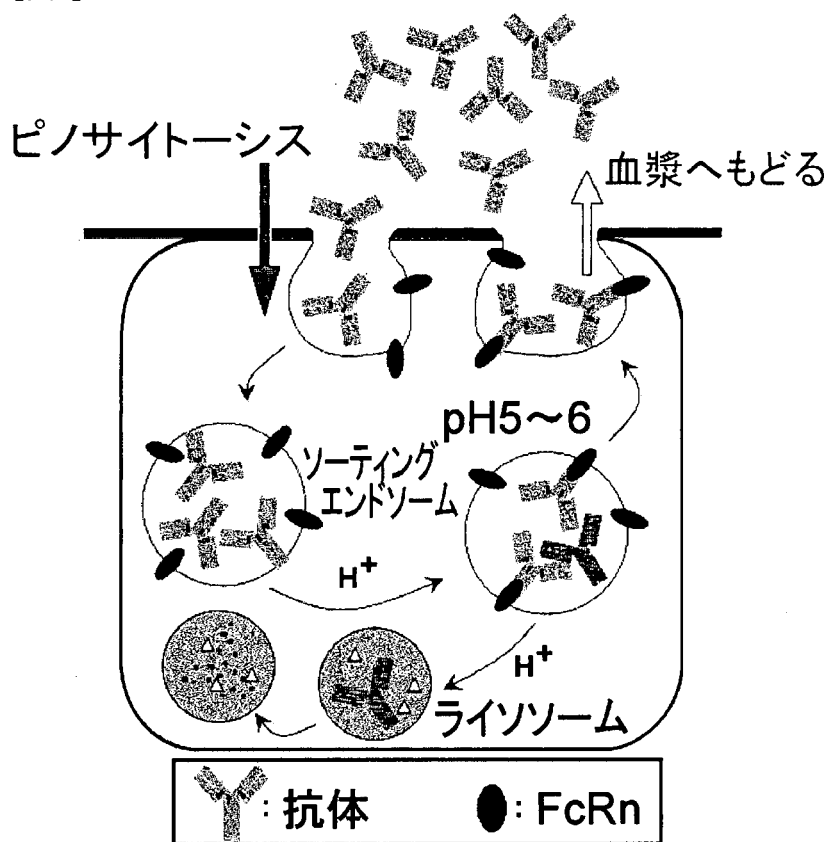
[図1]

血管

抗原を介したエンドサイトーシス
(インターナライゼーション)



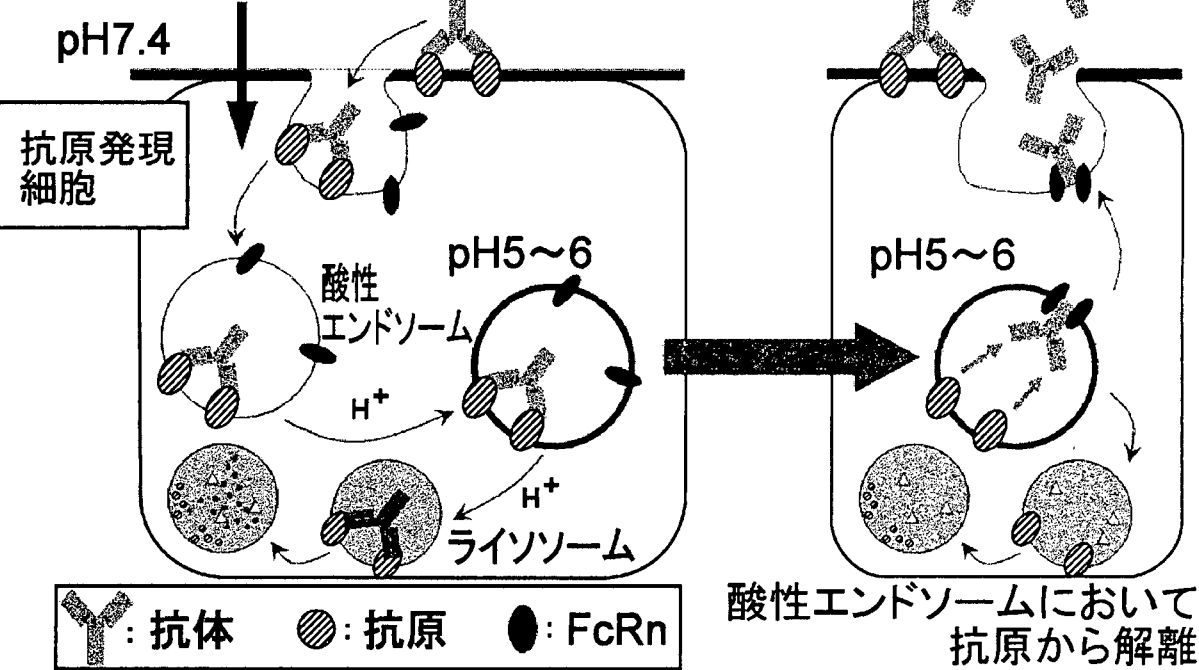
[図2]



[図3]

血管

抗原を介したエンドサイトーシス
(インターナライゼーション)



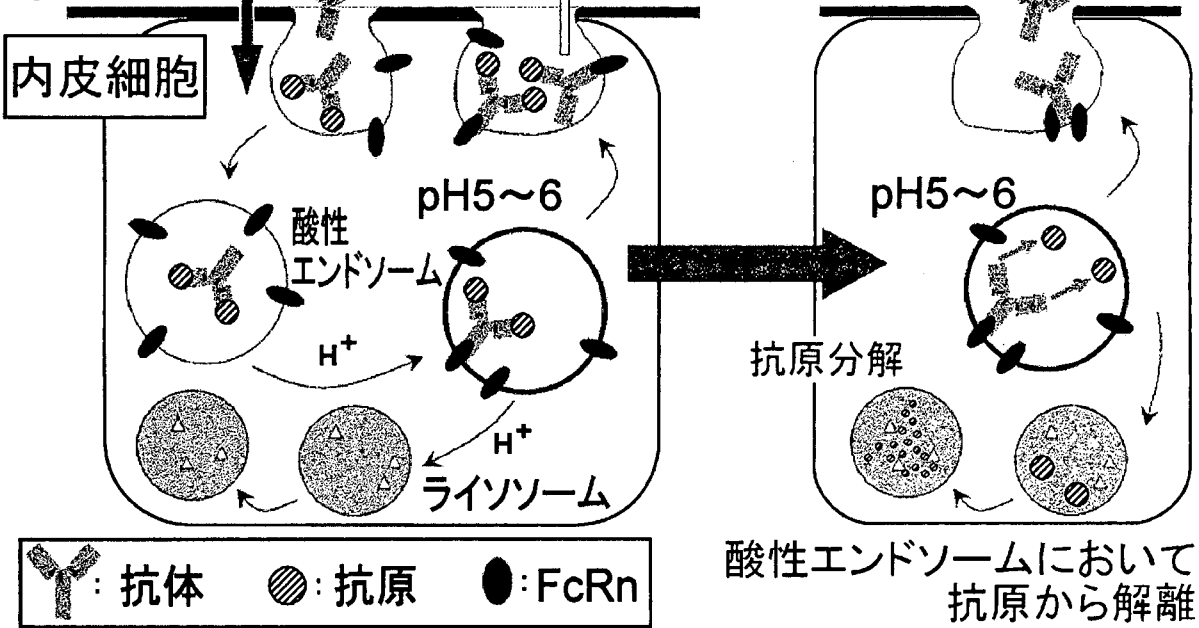
[図4]

血管

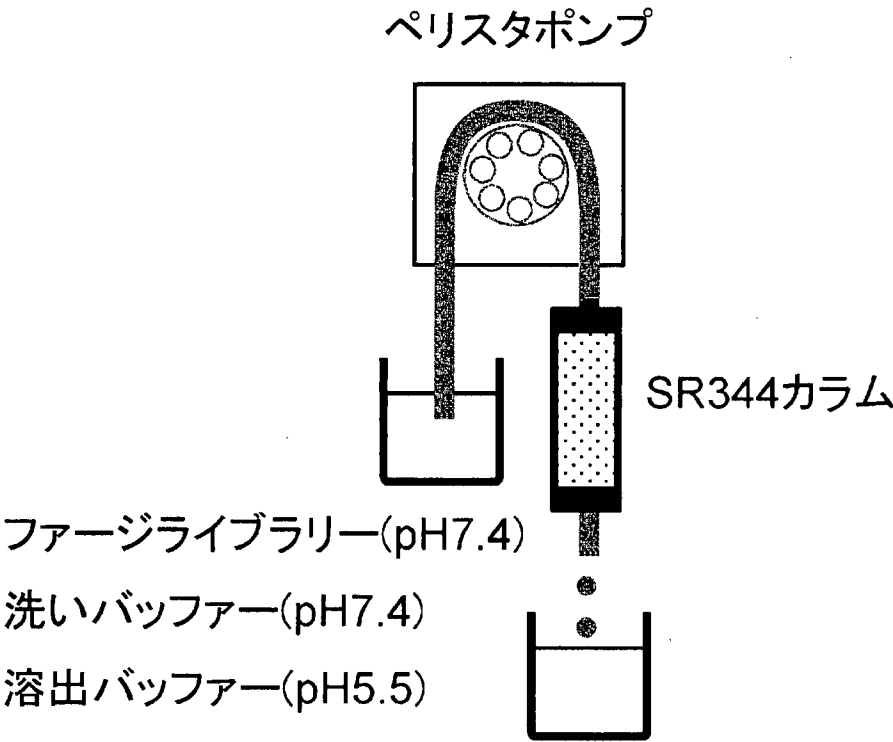
非特異的
エンドサイトーシス

pH 7.4

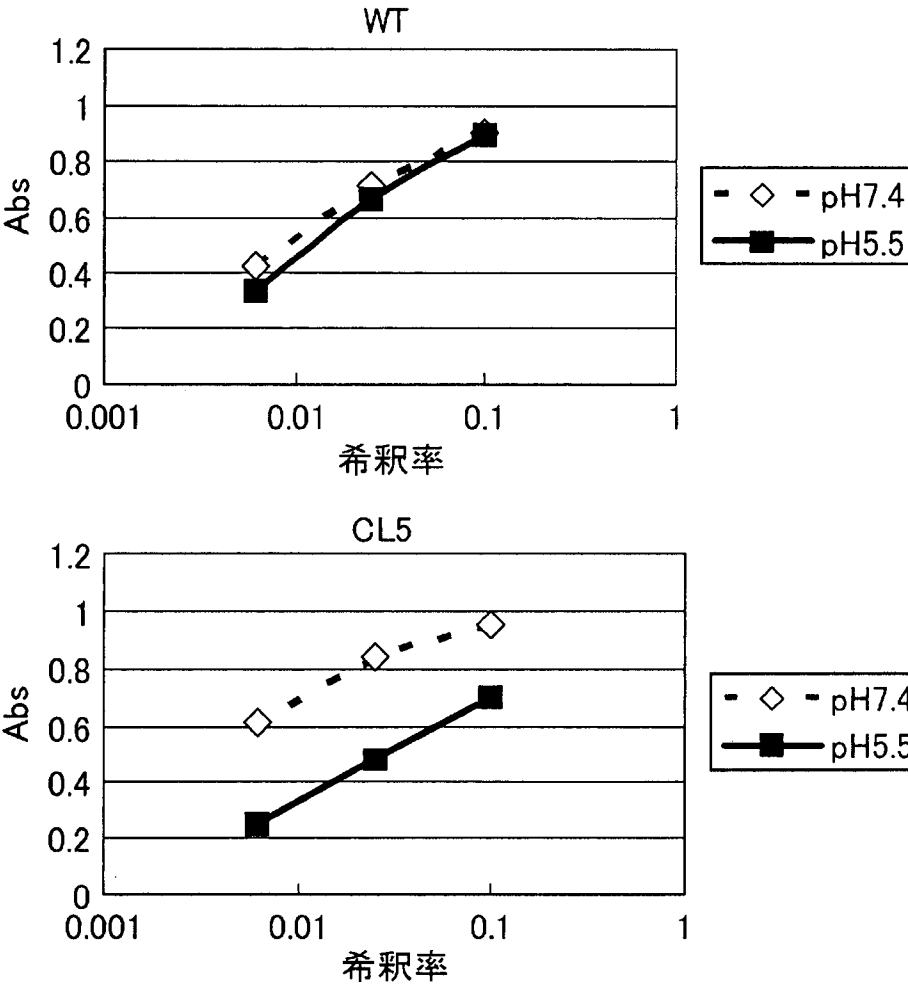
内皮細胞

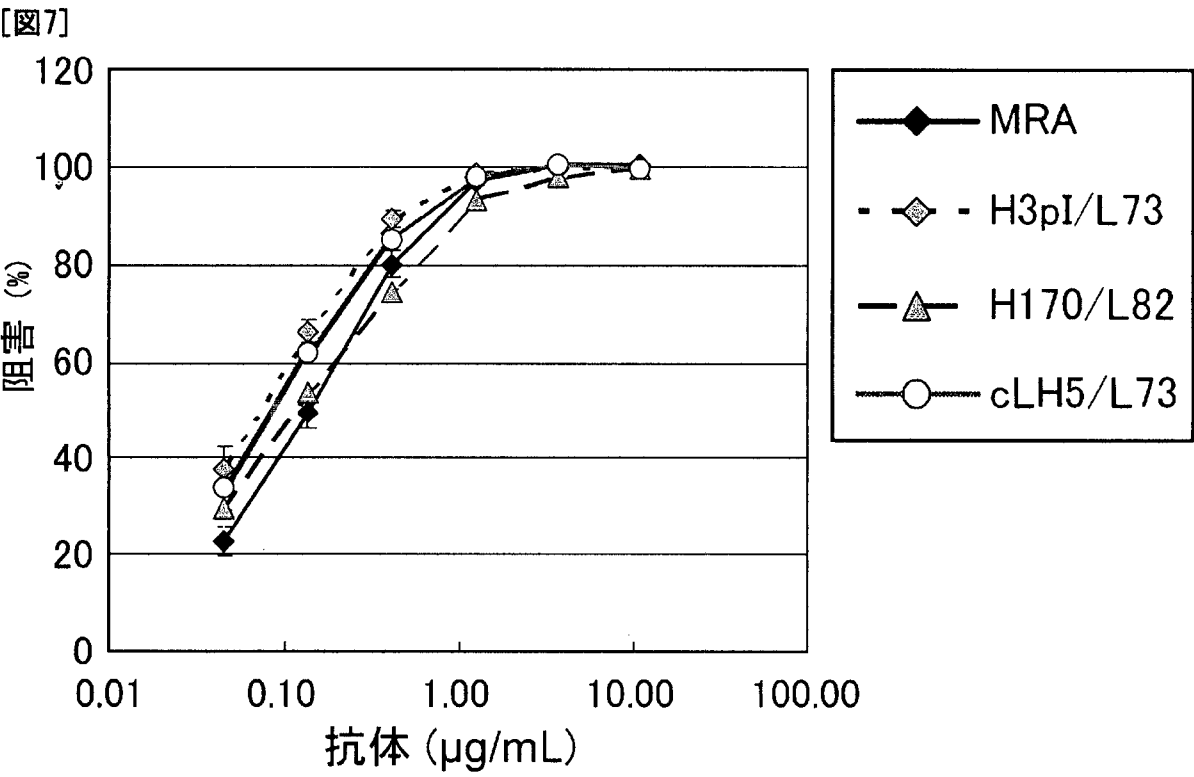


[図5]

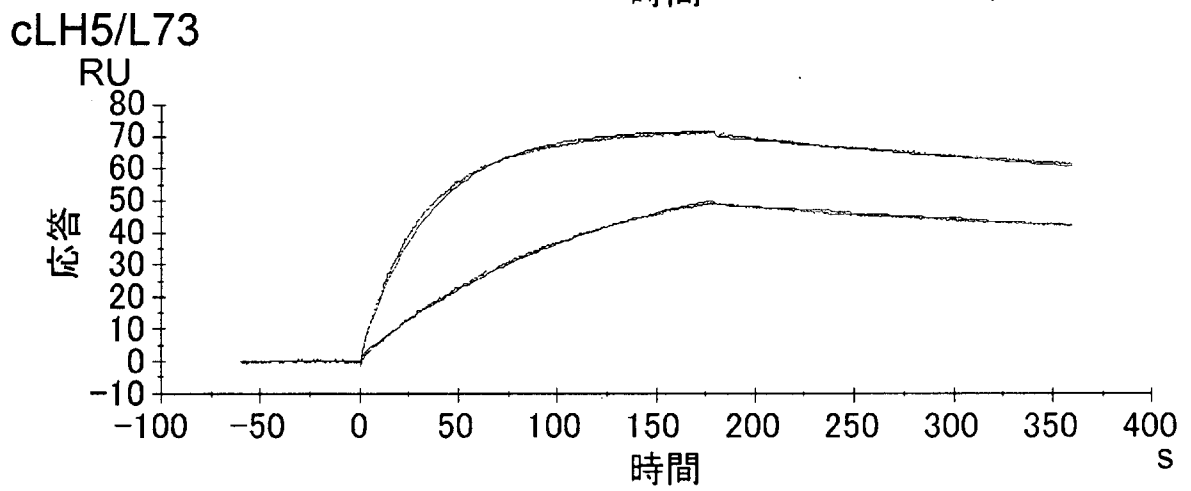
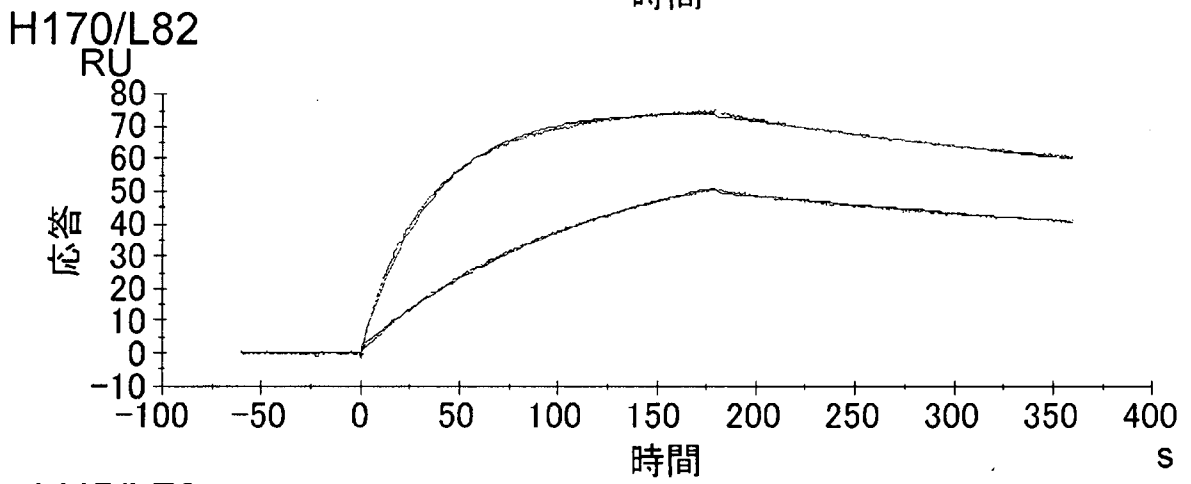
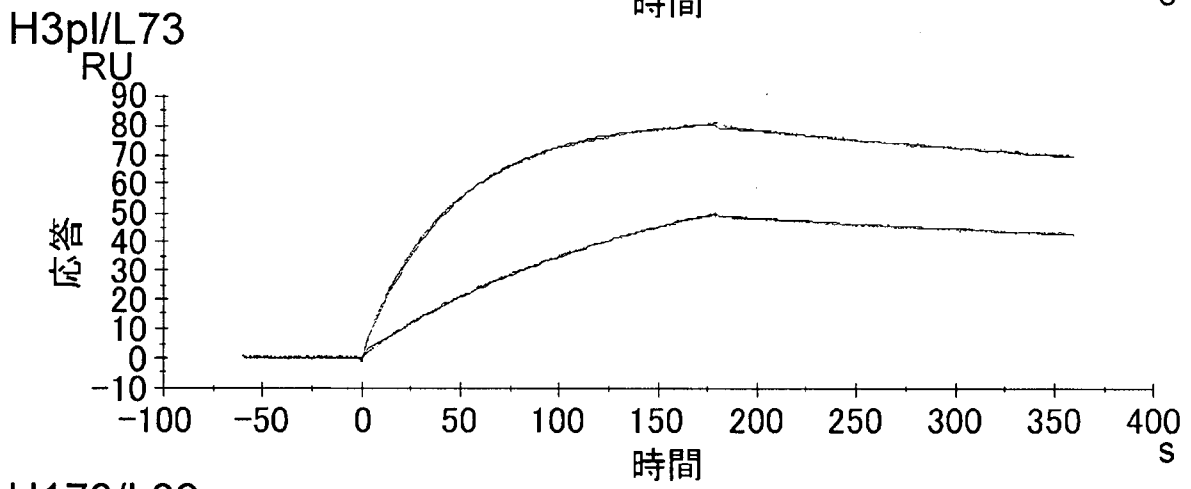
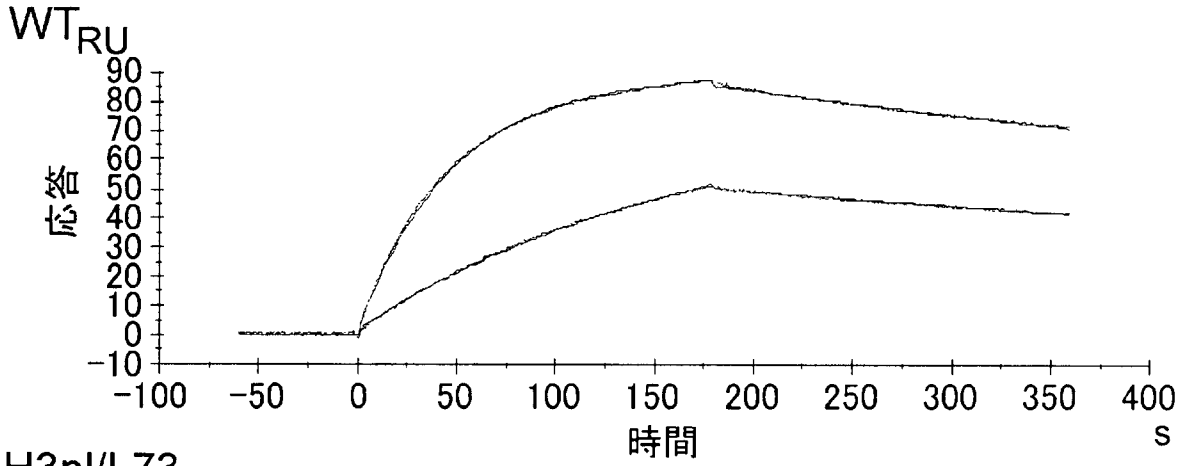


[図6]



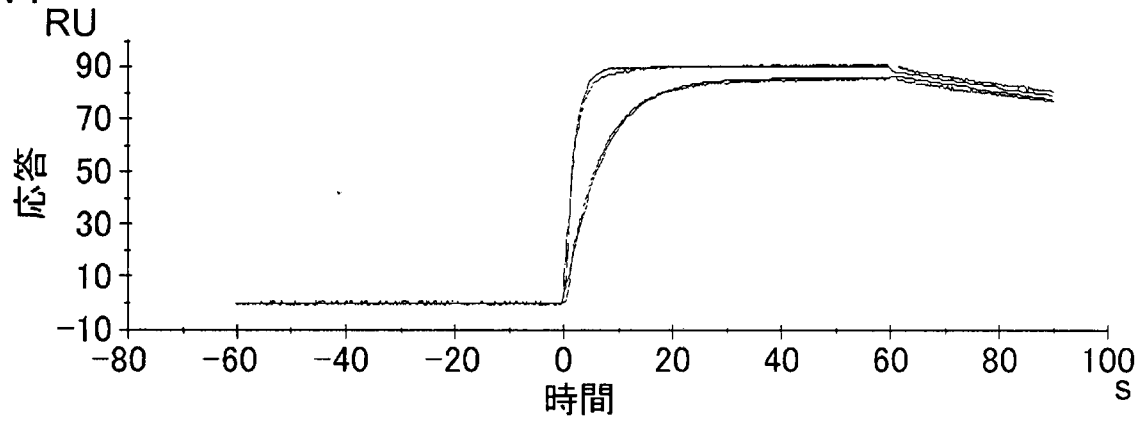


[図8]

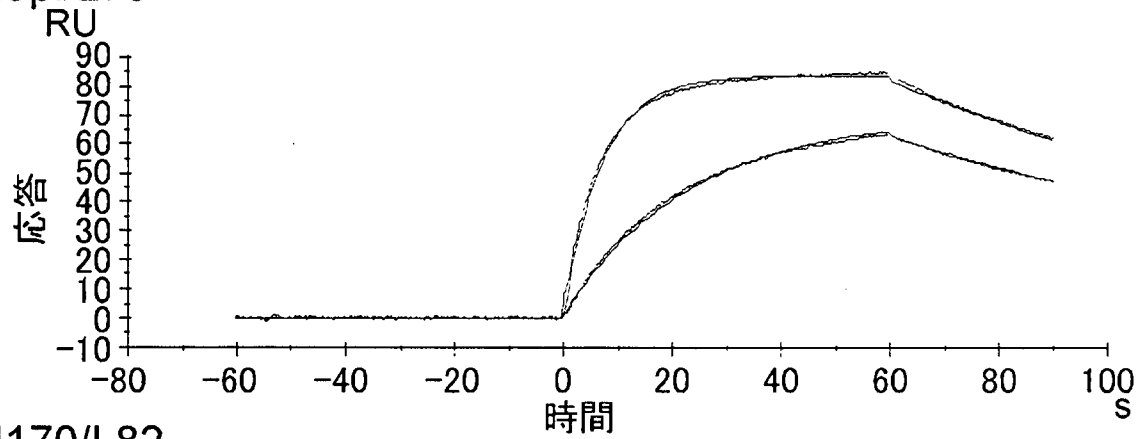


[図9]

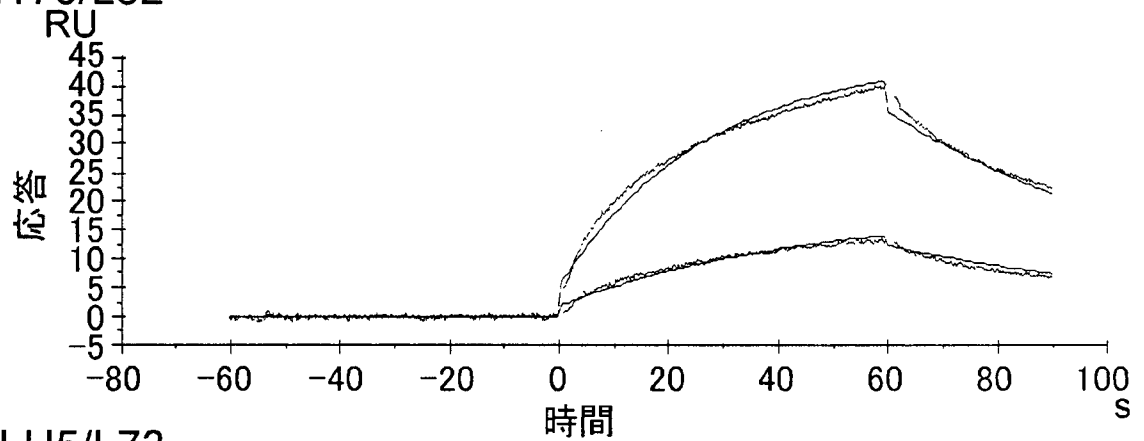
WT



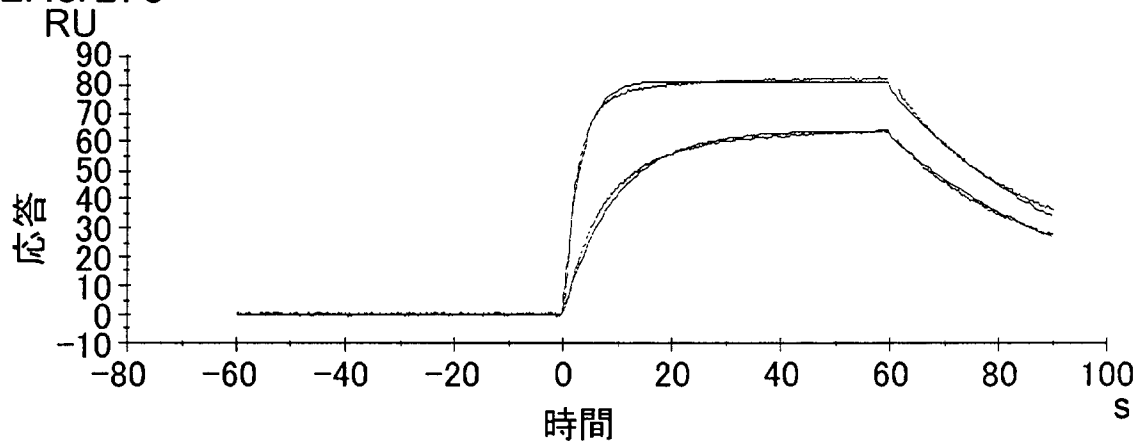
H3p/L73



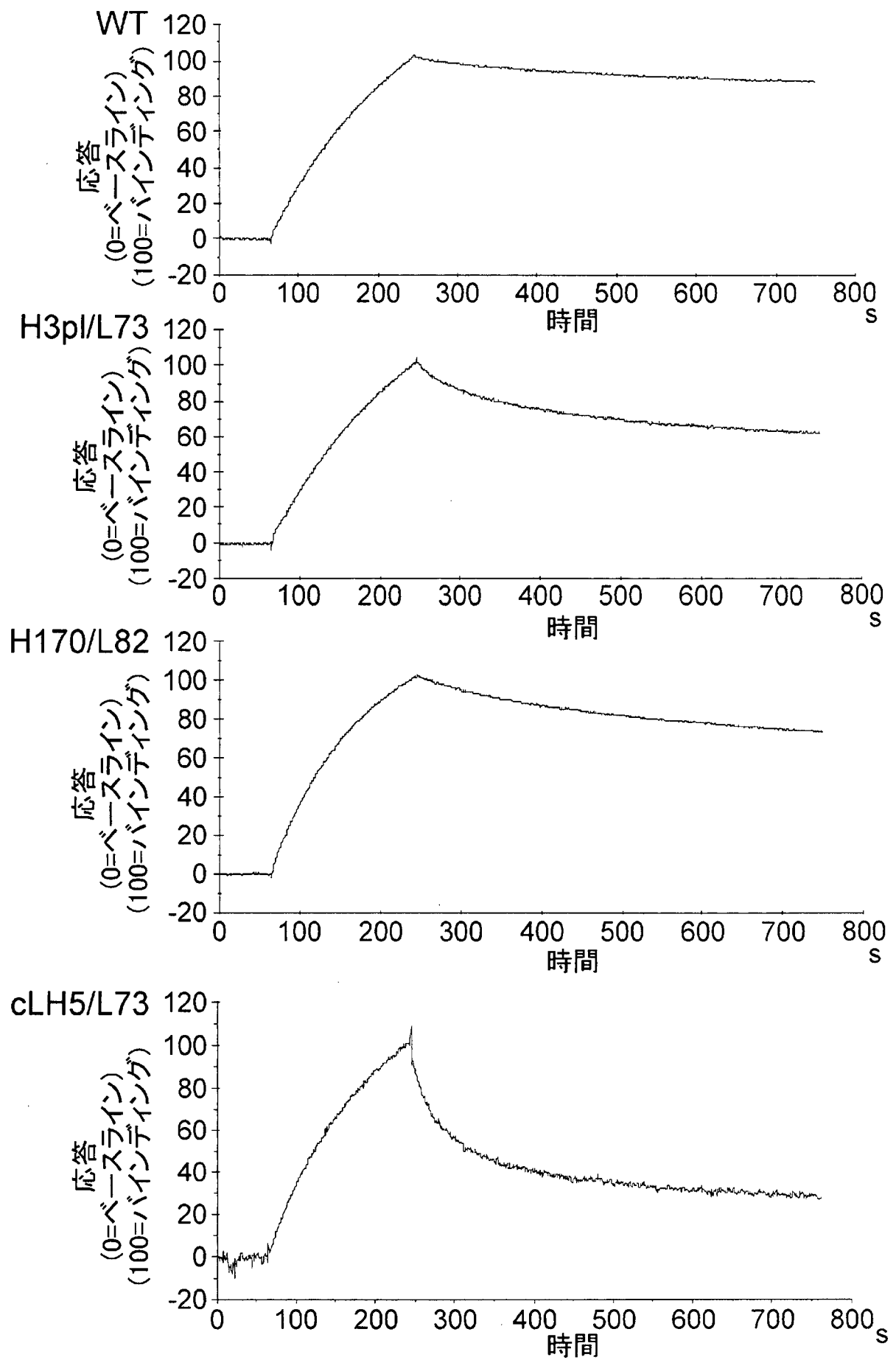
H170/L82



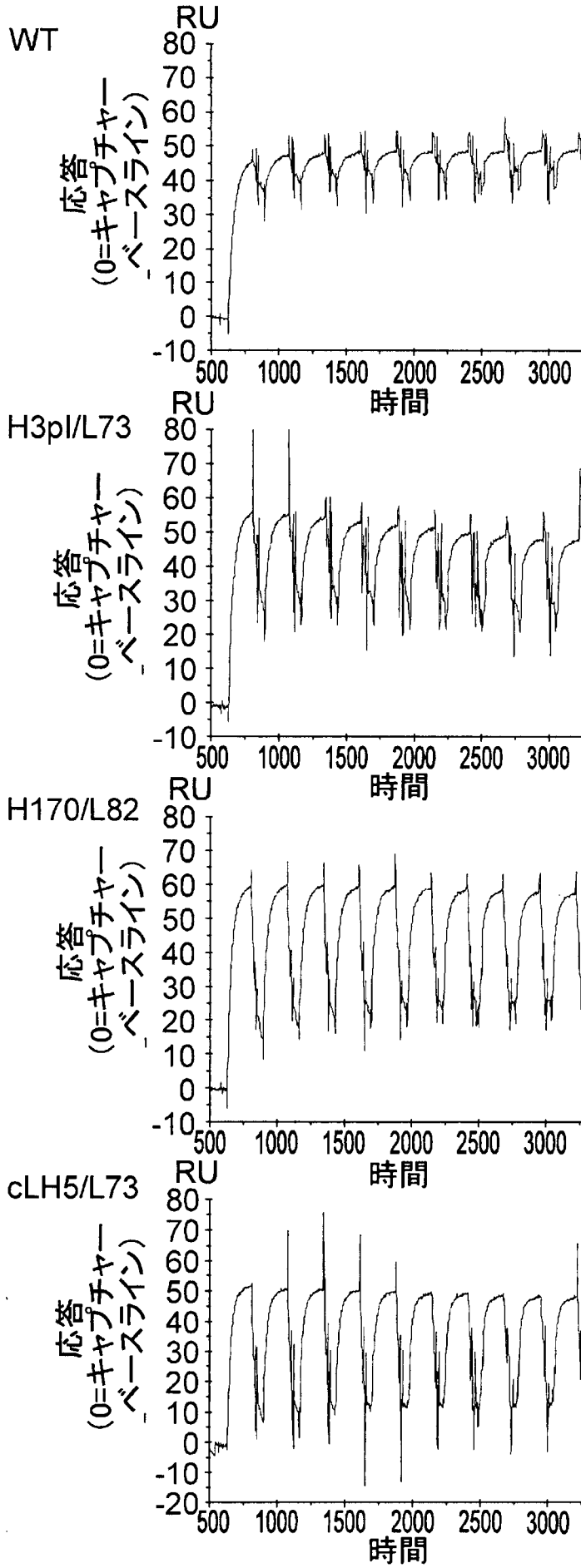
cLH5/L73



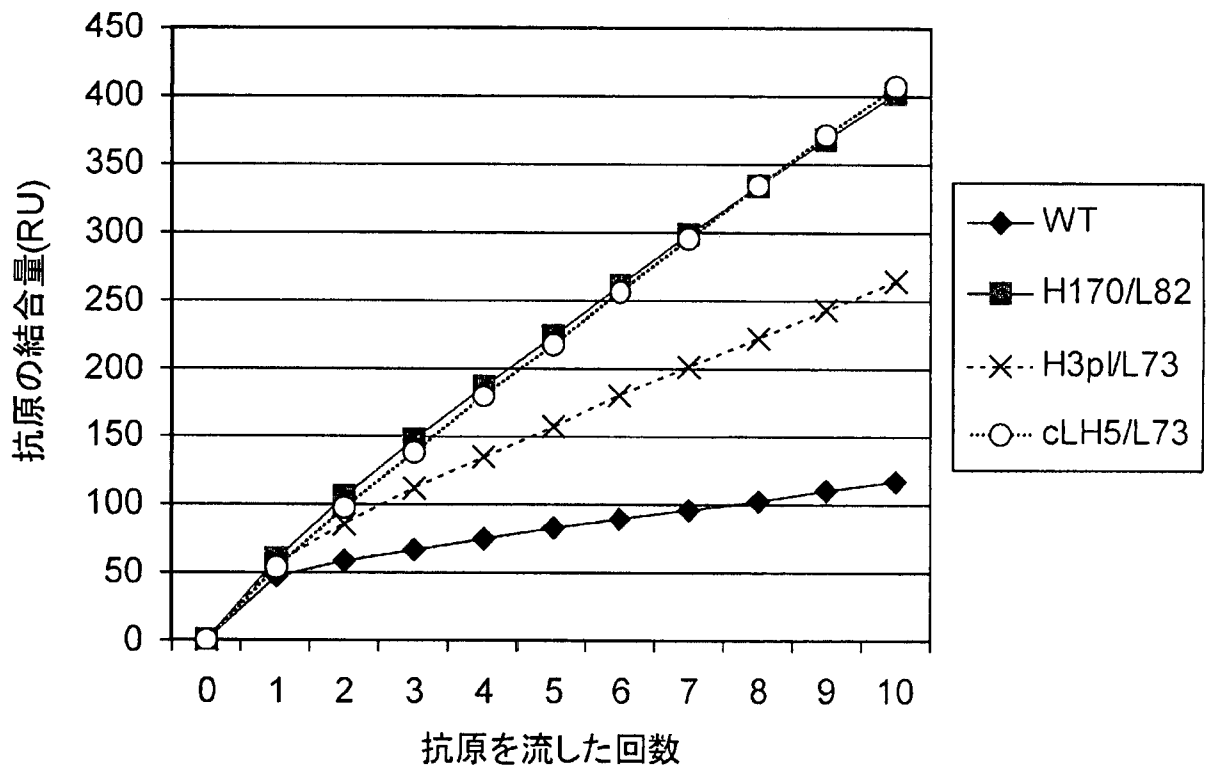
[図10]



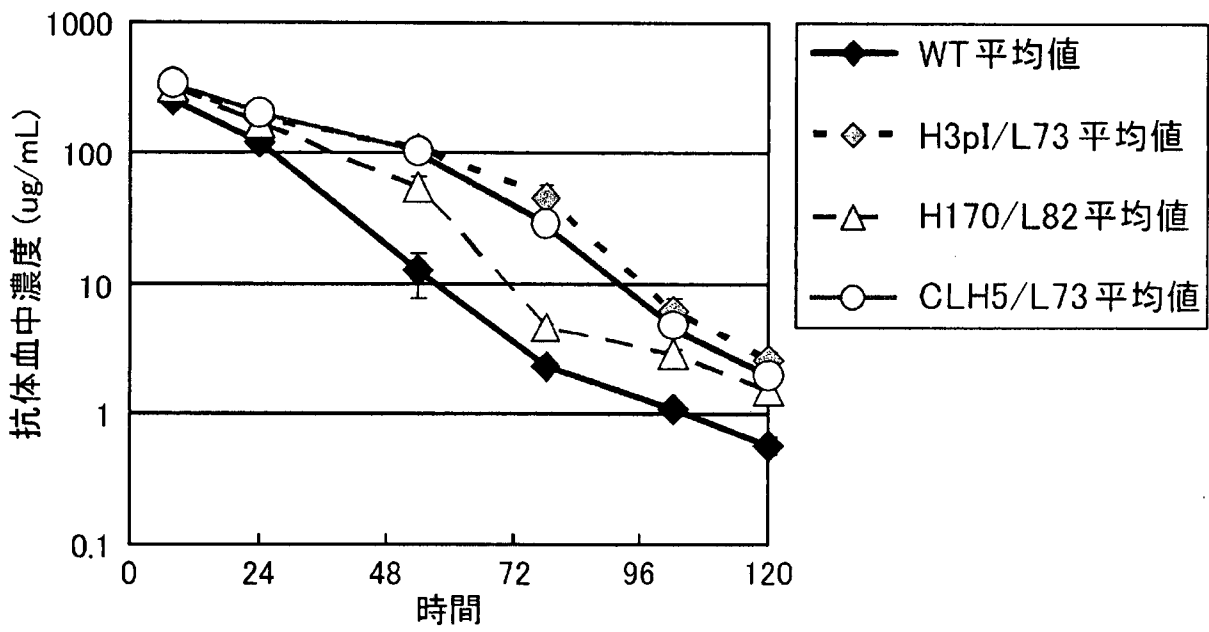
[図11]



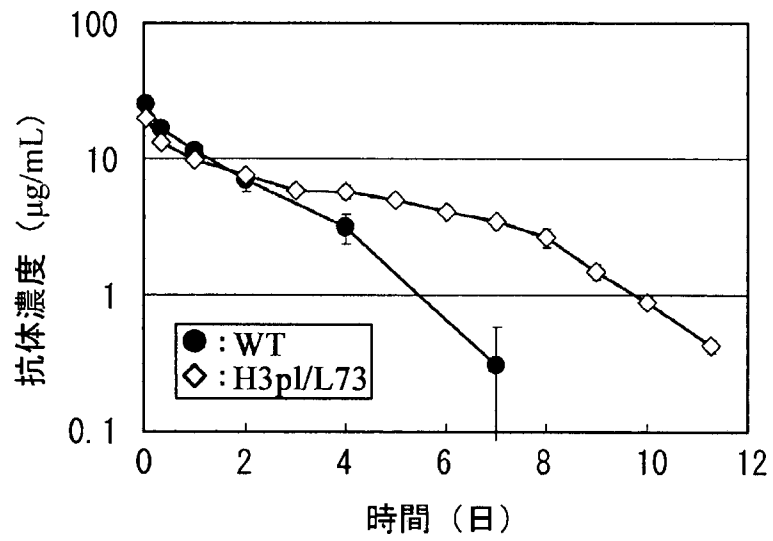
[図12]



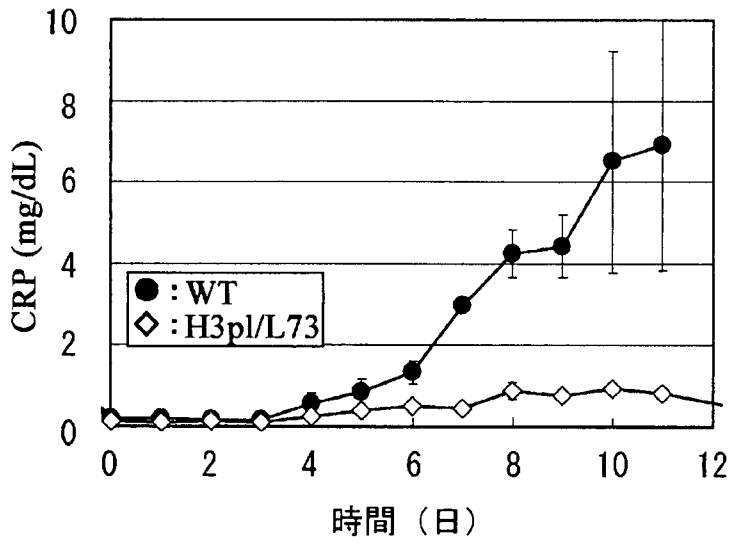
[図13]



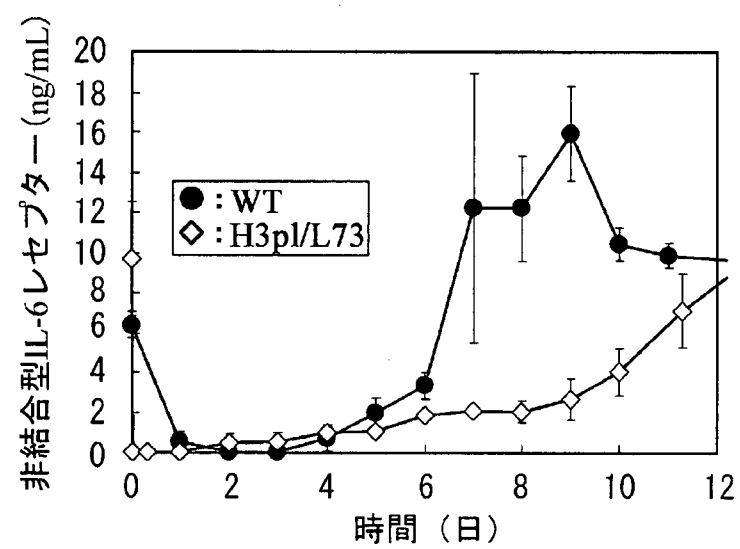
[図14]



[図15]

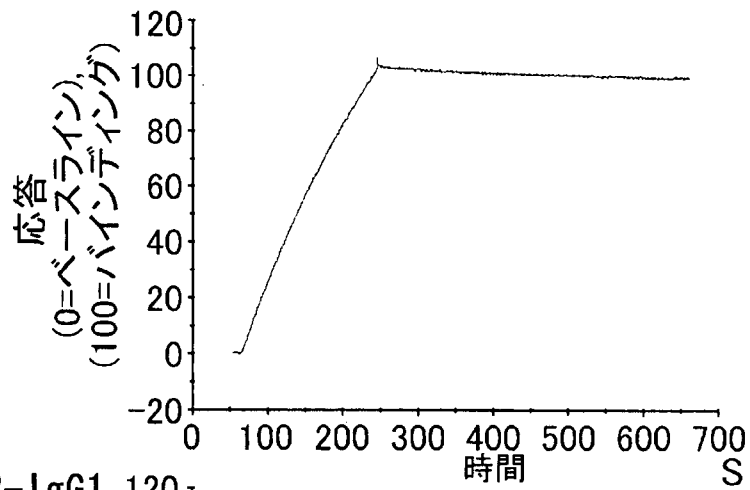


[図16]

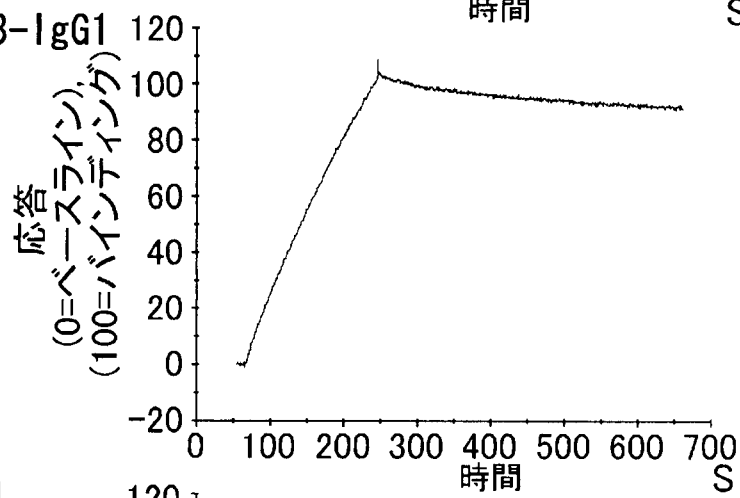


[図17]

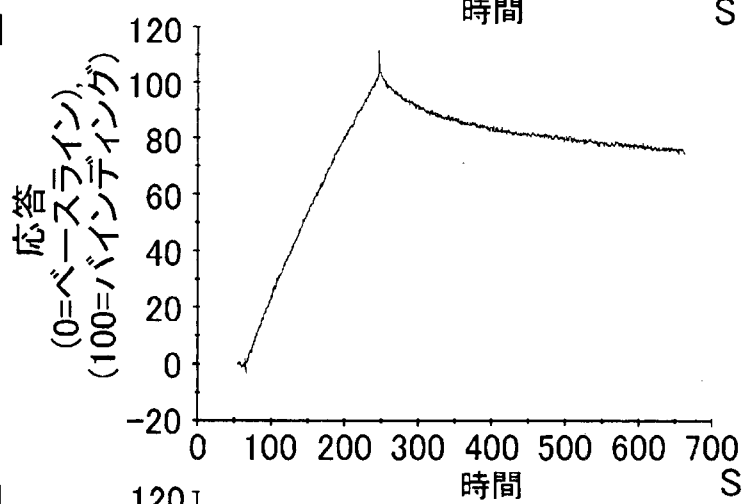
WT



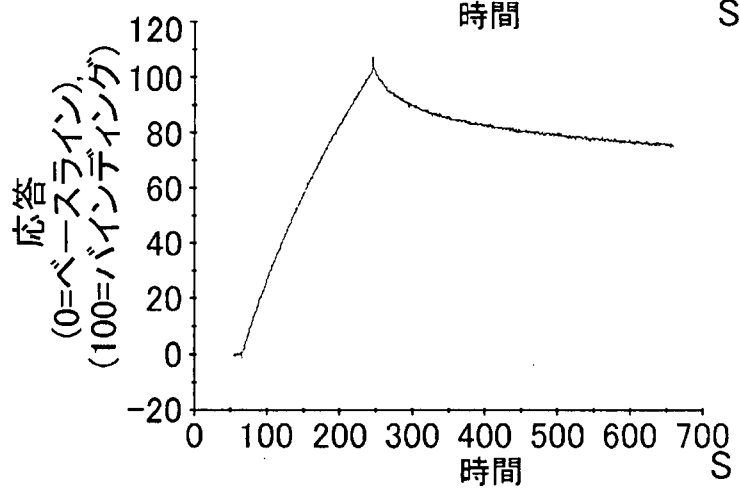
H3p1/L73-IgG1



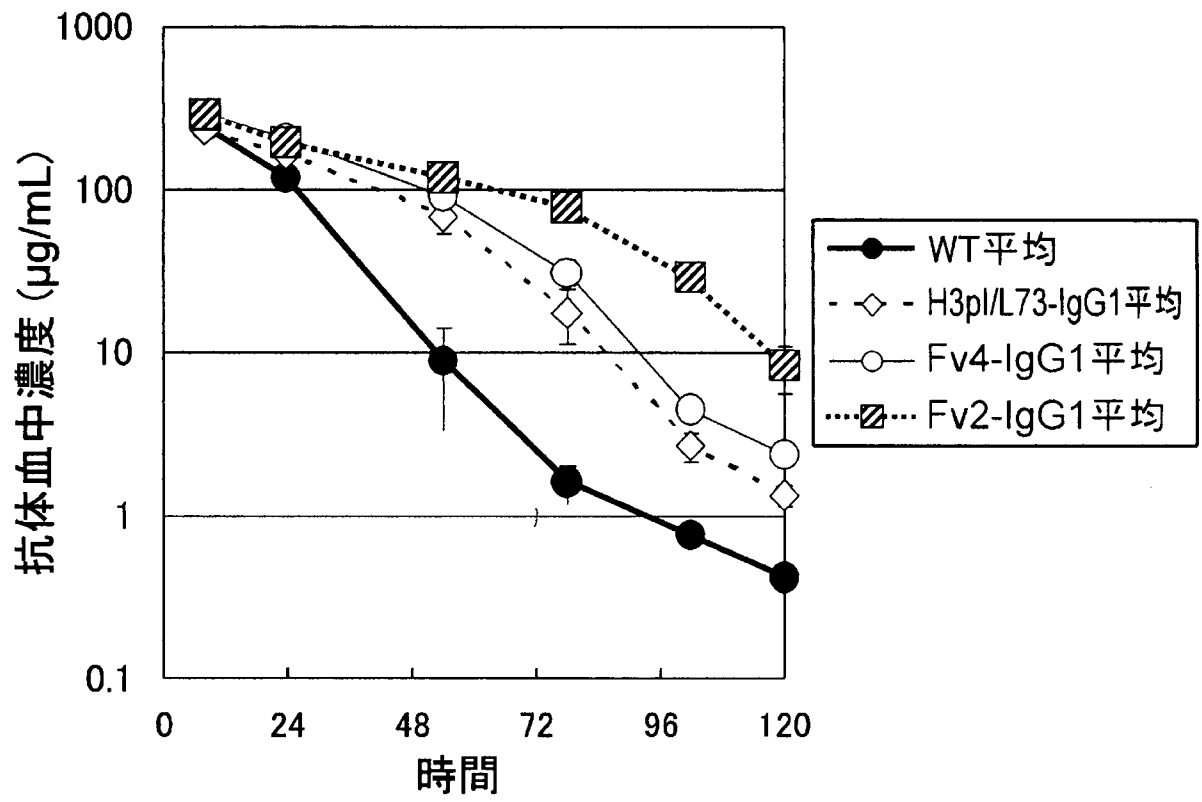
Fv2-IgG1



Fv4-IgG1

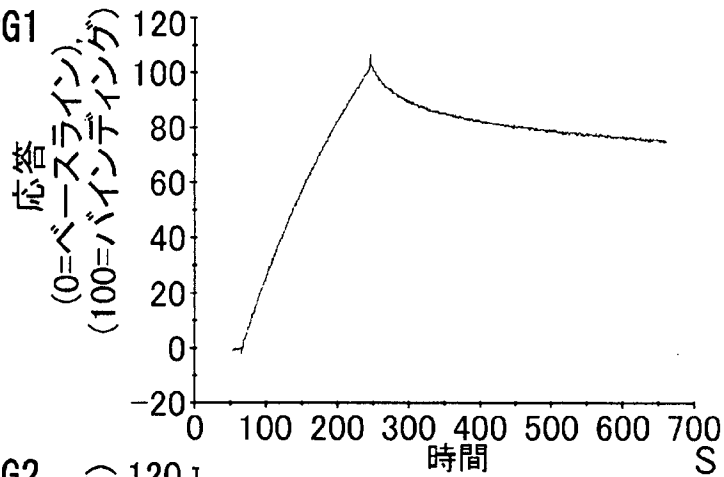


[図18]

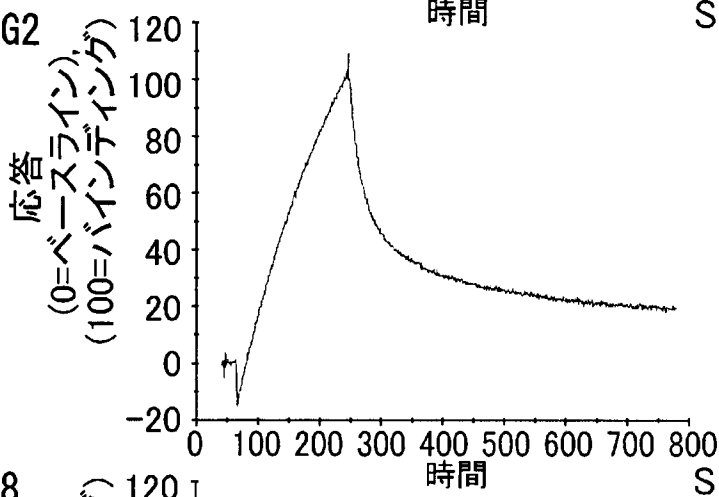


[図19]

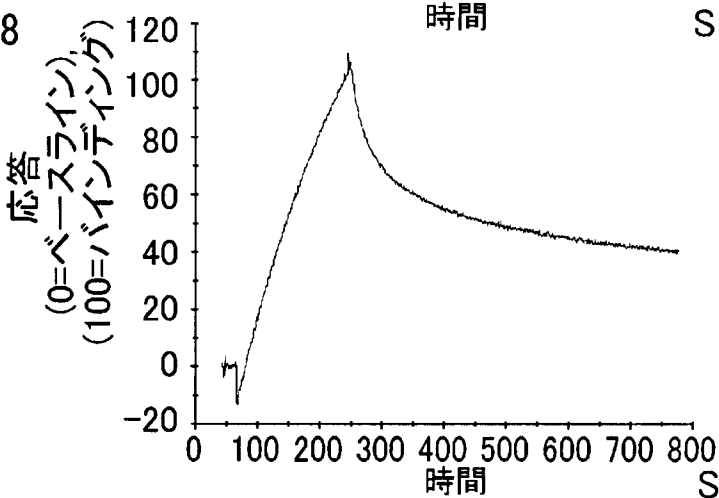
Fv4-IgG1



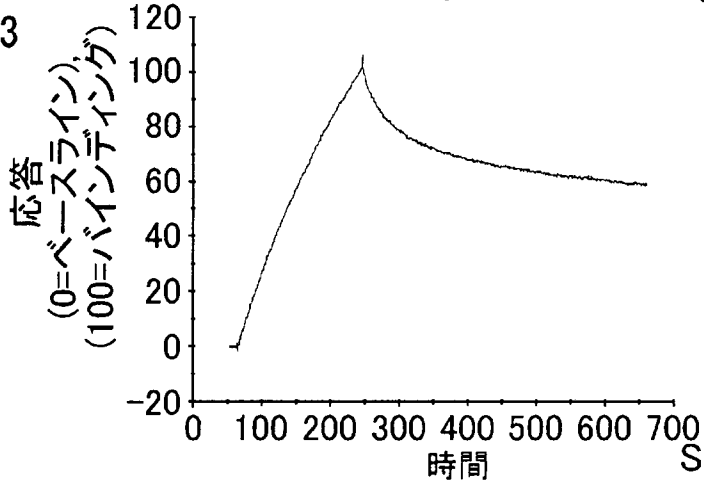
Fv4-IgG2



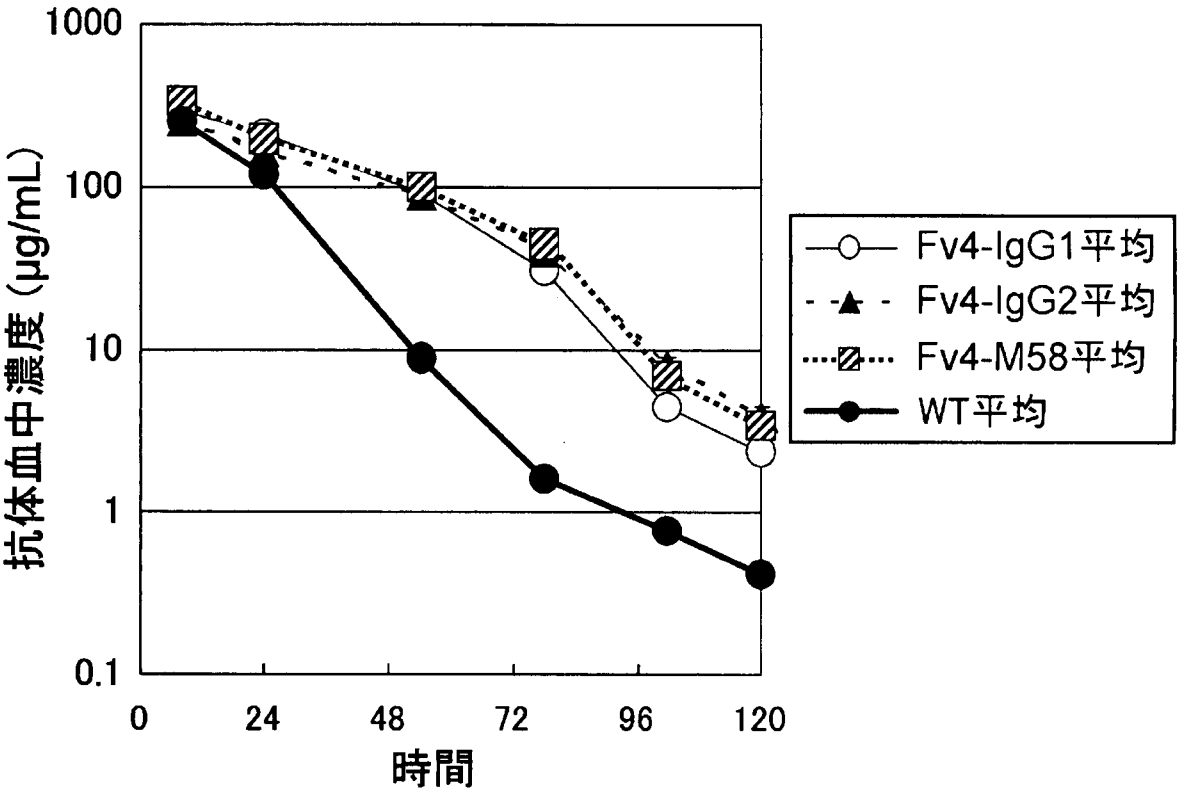
Fv4-M58



Fv4-M73

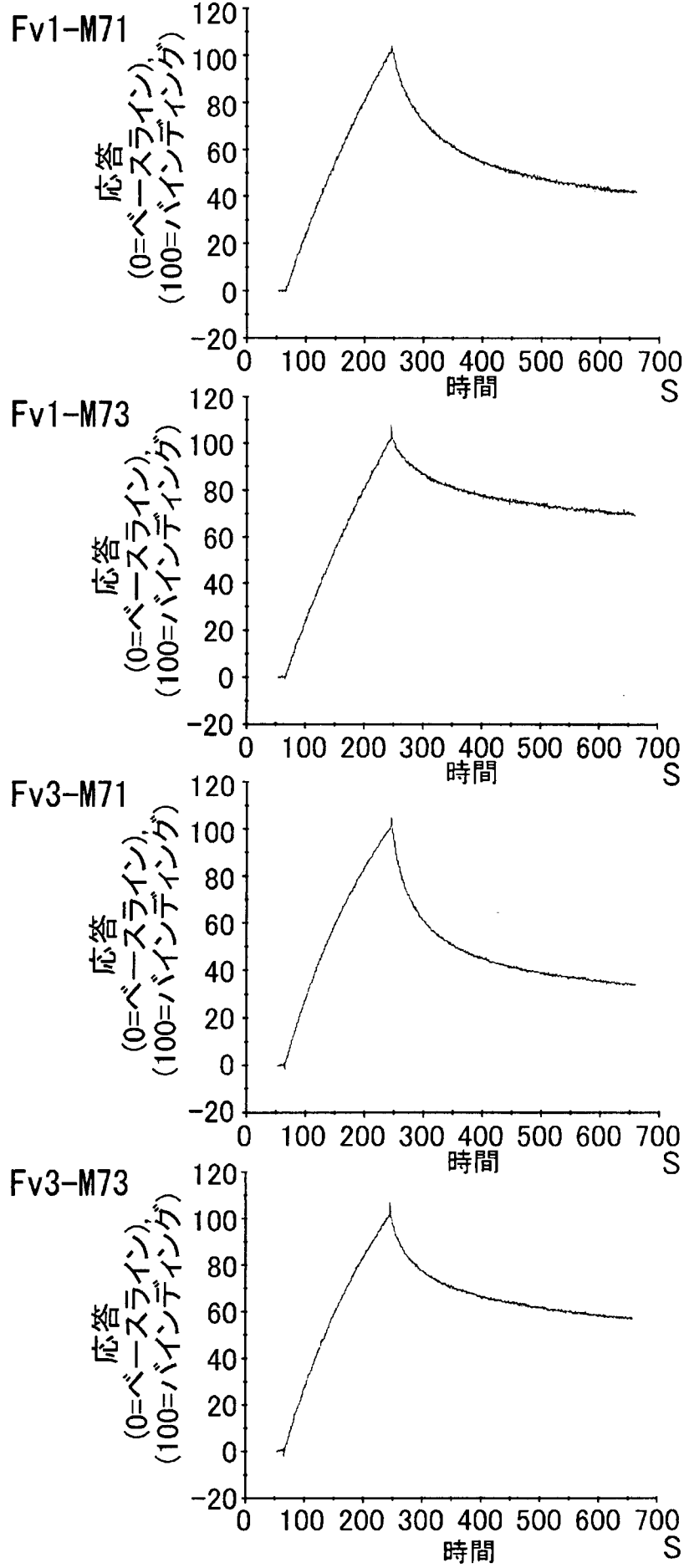


[図20]

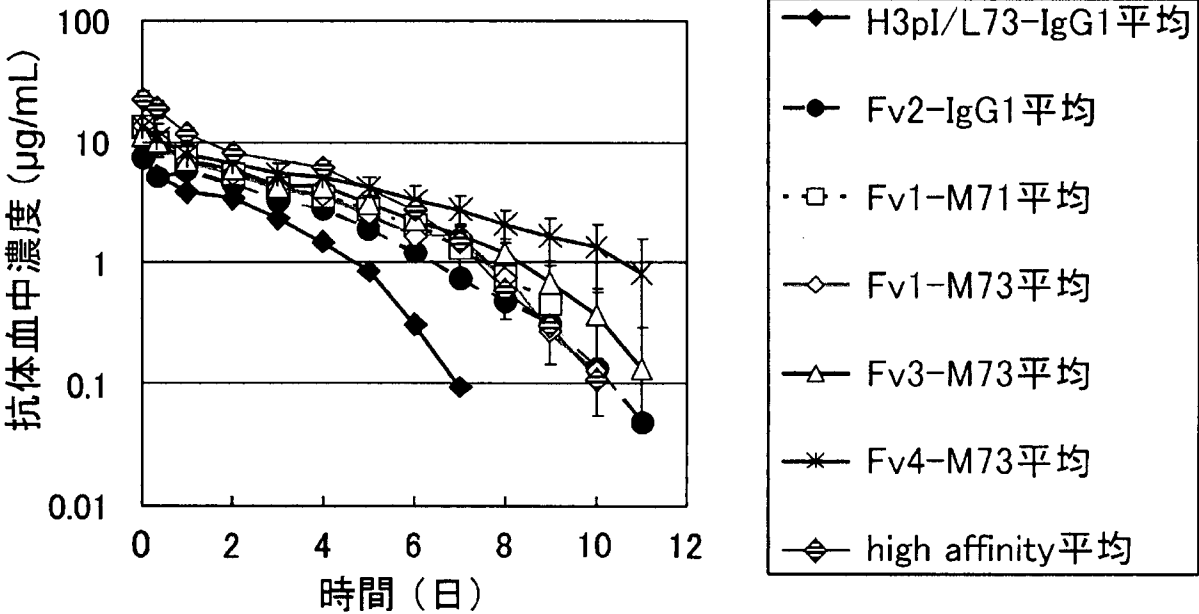


346

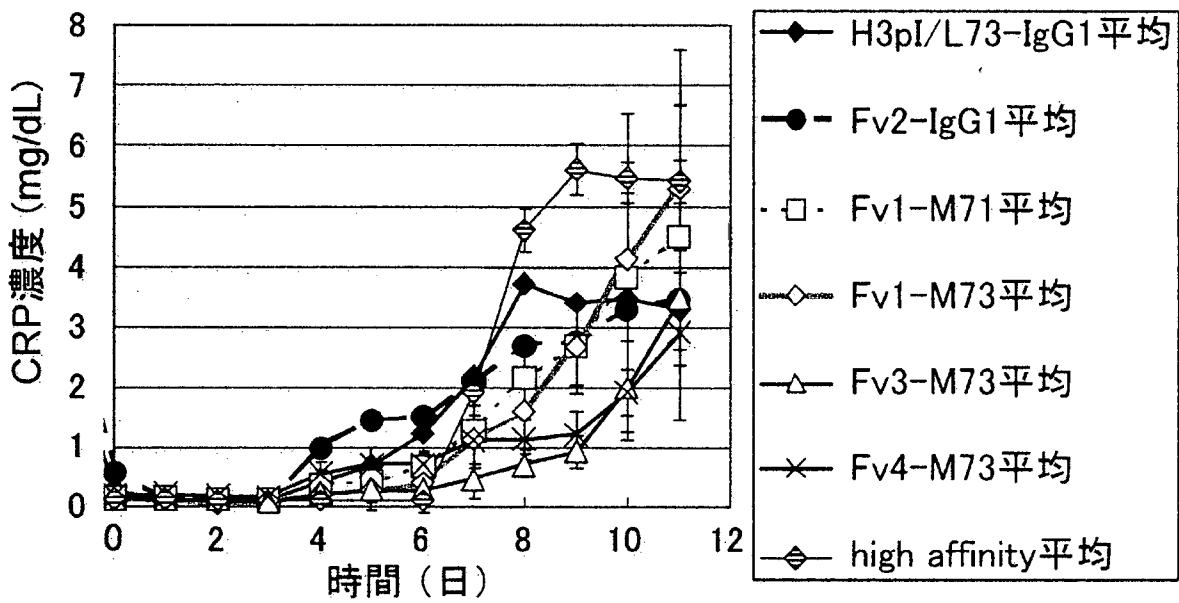
[図21]



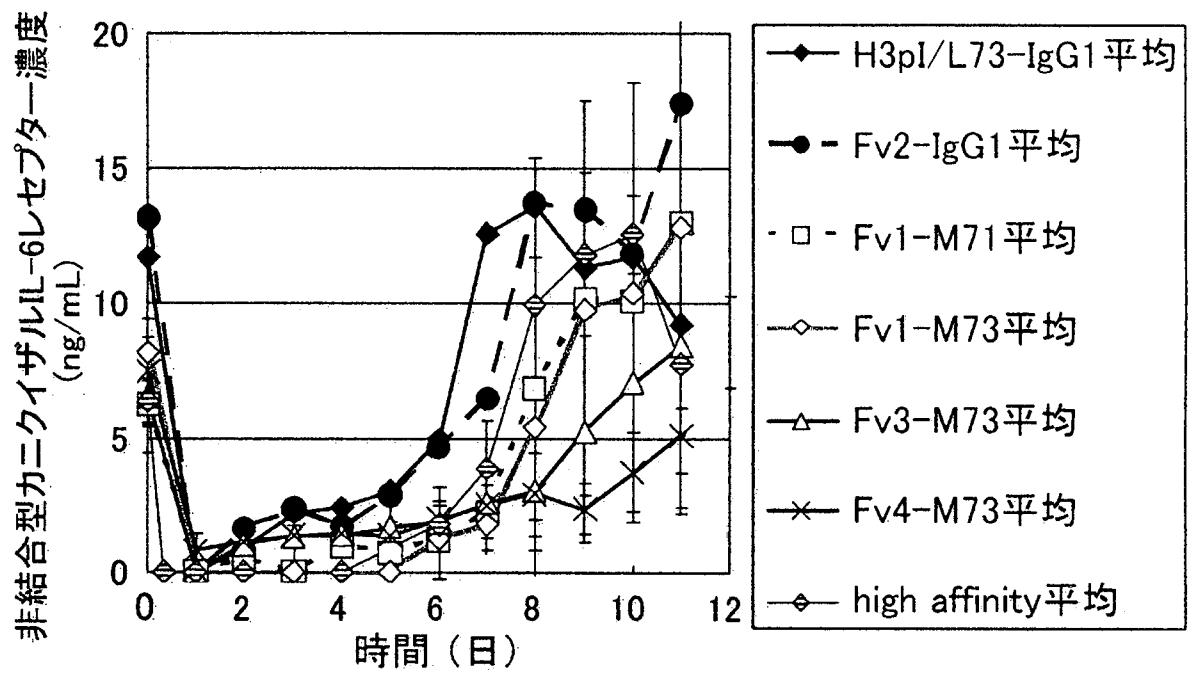
[図22]



[図23]



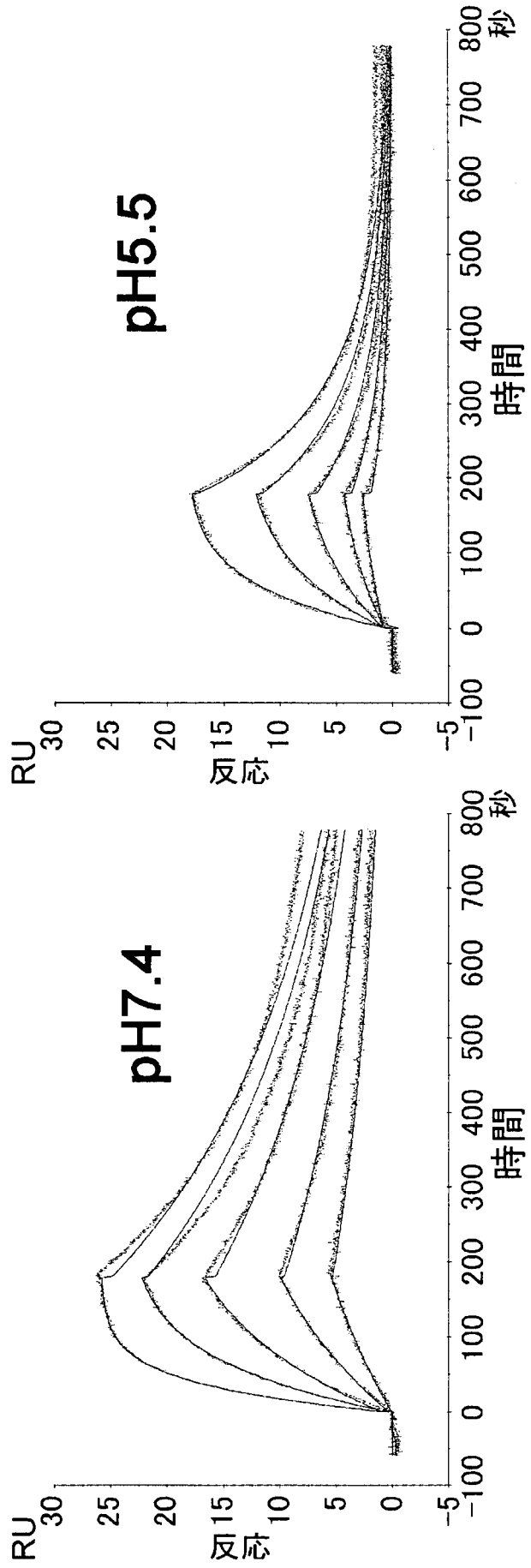
[図24]



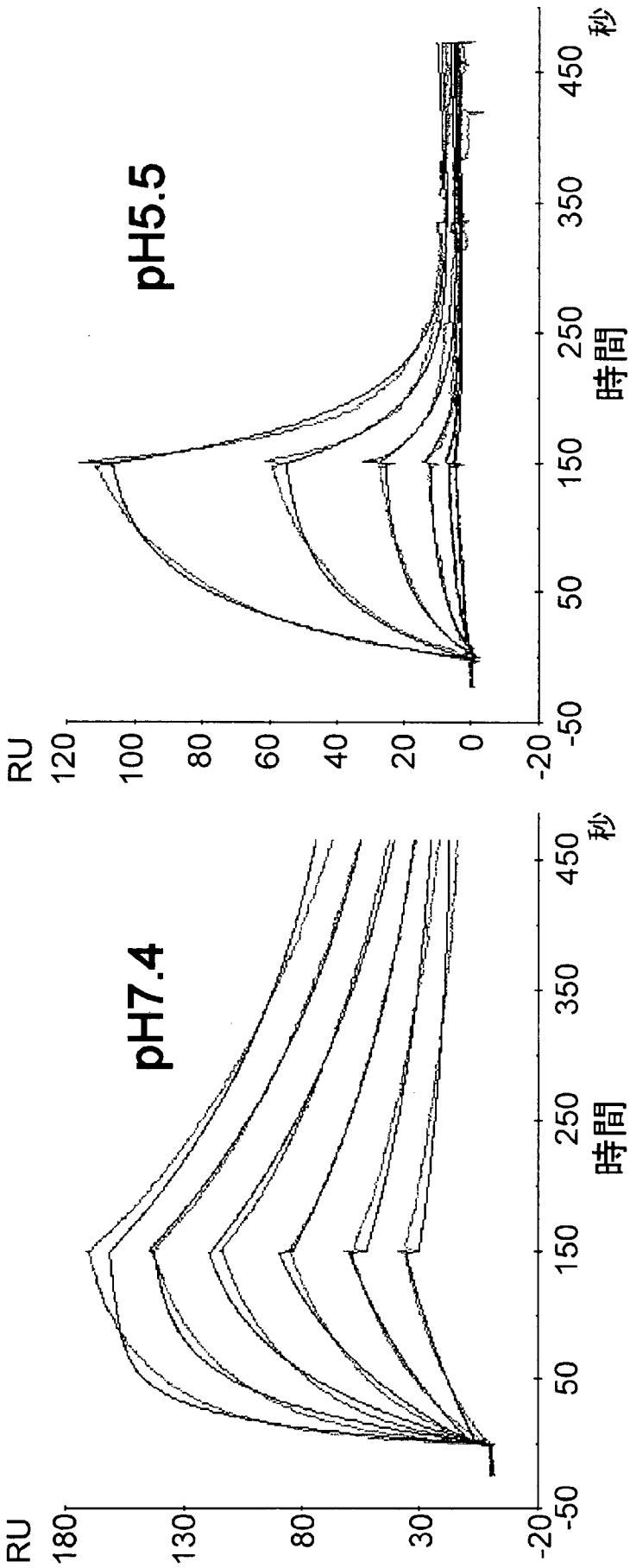
[図25]

<重鎖>									
VH1 : QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSIS									
VH2 : QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSIS									
VH3 : QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGHSIS									
VH4 : QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGHSIS									
* * * * *									
FR1		CDR1	FR2		CDR2				
		HDHWS	WVRQPPGEGLEWIG		HISYSGITNYPHLQD				
		HDHWS	WVRQPPGEGLEWIG		HISYSGITNYPHLQD				
		HDHWS	WVRQPPGEGLEWIG		FISYSGITNYPNPSLQG				
		HDHWS	WVRQPPGEGLEWIG		FISYSGITNYPNPSLQG				
* * * * *									
FR3									
FR4									
VH1 : RVTISRDTSKNQFSLKSSVTAADTAAYYCAR									
VH2 : RVTISRDTSKNQFSLKSSVTAADTAAYYCAR									
VH3 : RVTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR									
VH4 : RVTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR									
* * * * *									
FR3									
FR4									
<軽鎖>									
VL1 DIQMTQSPSSLSASVGDSTITTC									
VL2 DIQMTQSPSSLSASVGDSTITTC									
VL3 DIQMTQSPSSLSASVGDSTITTC									
* * * * *									
FR1		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
* * * * *									
FR1									
		CDR1	FR2		CDR2		FR3		FR4
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASRDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLES		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDAATYYC		GGGNRLPYT FGQGTKVEIE
		QASTDISSHLN	WYQKPGKAPPELLIY		YGSHLLS		GVPSRFSGSGSGTFTFTISSLEAEDA		

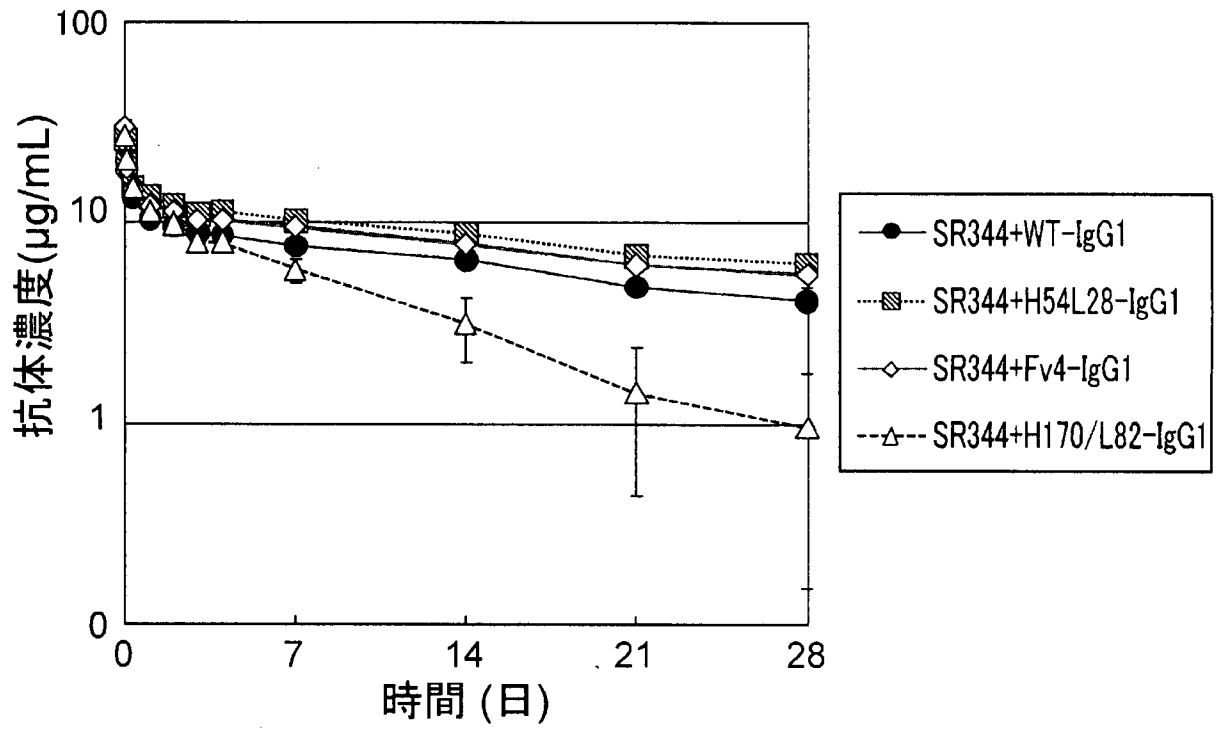
[図26]



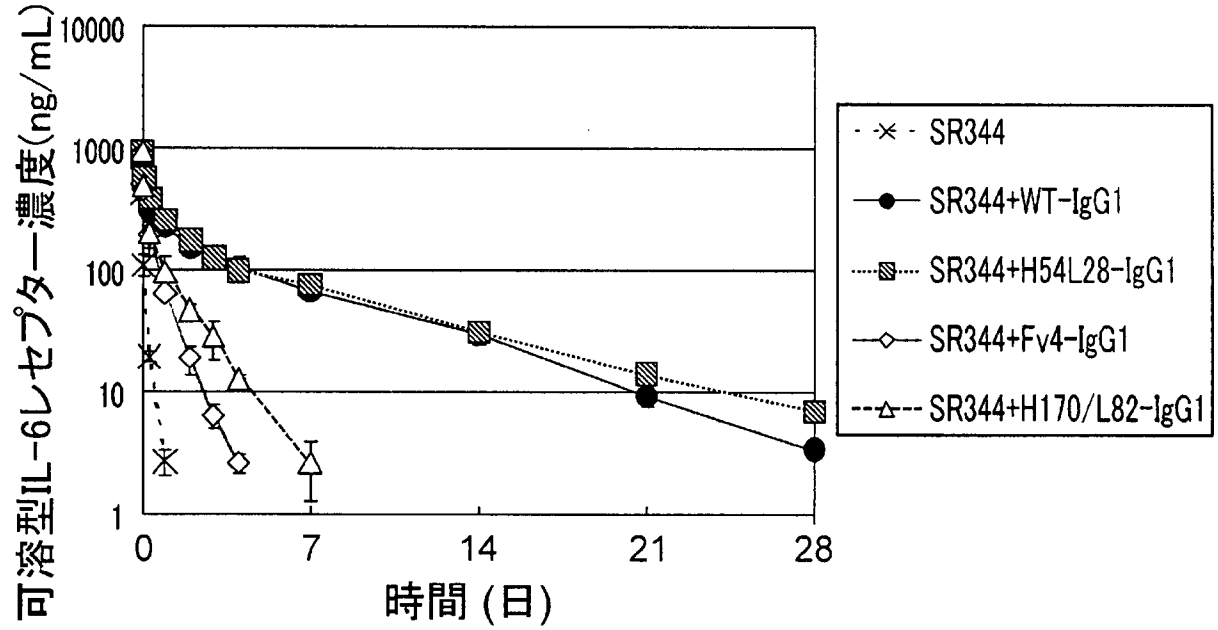
[図27]



[図28]



[図29]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/057309

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K16/28, A61K39/395, C12P21/08, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	ITO, W.et al. The His-probe method: effects of histidine residues introduced into the complementarity-determining regions of antibodies on antigen-antibody interactions at different pH values. FEBS Lett., 1992, Vol.309, No.1, p.85-88	<u>1-8, 28-50</u> 9-27
A	MARTIN, W.L.et al. Crystal Structure at 2.8Å of an FcRn/Heterodimeric Fc Complex: Mechanism of pH-Dependent Binding. Mol.Cell., 2001, Vol.7, p.867-877	1-50

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 April, 2009 (22.04.09)

Date of mailing of the international search report

07 July, 2009 (07.07.09)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/057309

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions of claims 1-50 include the following three inventions: an invention relating to an antigen-binding antibody which has a lower binding activity at pH 5.8 than that at pH 7.4 as claimed in claims 1 and 9-14; an invention relating to a method involving the step of substituting an amino acid residue in an antigen-binding molecule by a histidine residue or inserting a histidine residue into the antigen-binding molecule as claimed in claims 18-23; and an invention relating to a method for the screening or production of an antigen-binding molecule having a higher binding activity at a first pH value than that at a second pH value as claimed in claims 28, 30-32 and (continued to extra sheet)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/057309

Continuation of Box No. III of continuation of first sheet (2)

43-46.

Further, at least the method for producing an antibody having a reduced antigen-binding activity under acidic conditions by inserting a histidine residue is known (see FEBS Lett., 1992, Vol. 309, No. 1, p. 85-88). Therefore, the above-stated three inventions share no common special technical feature, and cannot be regarded as being so linked to one another as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/28, A61K39/395, C12P21/08, G01N33/15, G01N33/50			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2009年 日本国実用新案登録公報 1996-2009年 日本国登録実用新案公報 1994-2009年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), WPI			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X A	ITO, W. et al. The His-probe method: effects of histidine residues introduced into the complementarity-determining regions of antibodies on antigen-antibody interactions at different pH values. FEBS Lett., 1992, Vol. 309, No. 1, p. 85-88	1-8, 28-50 9-27	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 22.04.2009		国際調査報告の発送日 07.07.2009	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 三原 健治 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4N 2937

357

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	MARTIN, W. L. et al. Crystal Structure at 2.8Å of an FcRn/Heterodimeric Fc Complex: Mechanism of pH-Dependent Binding. Mol. Cell., 2001, Vol. 7, p. 867-877	1-50

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☒ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☒ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項1-50に係る発明は、請求項1, 9-14に記載のpH5.8における結合活性がpH7.4における結合活性よりも低い抗原結合分子に関する発明と、請求項18-23に記載の抗原結合分子のアミノ酸をヒスチジンに置換又は挿入することを含む方法に関する発明と、請求項28, 30-32, 43-46に記載の第一のpHでの結合活性が第二のpHでの結合活性よりも高い抗原結合分子のスクリーニング方法又は製造方法に関する発明に係る、3の発明を包含している。

しかも、少なくともヒスチジン残基を導入することによる酸性条件下で抗原に対する結合性が低下した抗体の作製方法が公知（要すれば、FEBS Lett., 1992, Vol. 309, No. 1, p. 85-88を参照）である以上、これらの3の発明は特別な技術的特徴を共有しておらず、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☒ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-123949- -00000-0000

Fecha: 2010-10-06 14:49:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 -PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 359

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐