

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 225**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **02752269 .7**
96 Fecha de presentación: **12.07.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1539233**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.06.2005**

54 Título: **ANTICUERPOS SUPERHUMANIZADOS.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.12.2011

73 Titular/es:
FOOTE, JEFFERSON
3727 SUNNYSIDE AVENUE NORTH
SEATTLE, WA 98103, US

72 Inventor/es:
FOOTE, Jefferson

74 Agente: **de Justo Bailey, Mario**

ES 2 370 225 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos superhumanizados

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a procedimientos para humanizar anticuerpos, en particular para humanizar anticuerpos fabricando anticuerpos quiméricos que contienen secuencias de CDR a partir de un anticuerpo no humano y secuencias estructurales de anticuerpos humanos, más particularmente a procedimientos de selección de secuencias estructurales apropiadas de anticuerpos humanos para realizar la humanización y, aún más particularmente, al uso de tipos de estructura canónica de CDR del anticuerpo no humano en comparación con tipos de estructura canónica de CDR de línea germinal de anticuerpos humanos como base para seleccionar las secuencias estructurales humanas apropiadas para un anticuerpo humanizado.

15 **Antecedentes de la invención**

Los anticuerpos son proteínas naturales que forman el sistema inmunitario de los vertebrados como respuesta a sustancias extrañas (antígenos), principalmente para la defensa contra infecciones. Durante un siglo, los anticuerpos se han inducido en animales en condiciones artificiales y se han recogido para su uso en la terapia o el diagnóstico de afecciones patológicas o para investigación biológica. Cada célula individual productora de anticuerpos produce un único tipo de anticuerpos con una composición químicamente definida, no obstante, los anticuerpos obtenidos directamente a partir de suero animal como respuesta a la inoculación de antígenos comprenden realmente un conjunto de moléculas no idénticas (es decir, anticuerpos policlonales) producido a partir de un conjunto de células individuales productoras de anticuerpos.

La tecnología de hibridoma proporcionó un procedimiento para propagar una célula productora de anticuerpos durante un número indefinido de generaciones con un procedimiento de cribado para identificar clones de células que producen un anticuerpo que reaccionaría con un antígeno particular. El desarrollo de esta tecnología permitió la producción de cantidades ilimitadas de anticuerpos estructuralmente idénticos con, esencialmente, cualquier especificidad antigénica deseada. Dichos anticuerpos se denominan comúnmente anticuerpos monoclonales y se originan en su mayor parte en roedores. La secuenciación de genes de anticuerpos monoclonales permitió que se definiera la estructura primaria de aminoácidos de los anticuerpos.

El advenimiento de la metodología de ADN recombinante permitió el diseño estructural de genes de anticuerpos y la producción de moléculas de anticuerpos modificadas con propiedades que no pueden obtenerse mediante la tecnología de hibridoma. En la escena terapéutica, un objetivo de esta metodología ha sido reducir la inmunogenicidad en seres humanos de anticuerpos monoclonales de roedor modificando su estructura primaria de aminoácidos. La reducción de la inmunogenicidad de anticuerpos terapéuticos es deseable debido a que la inducción de una respuesta inmunitaria puede causar una serie de efectos secundarios en el paciente, variando desde la eliminación acelerada del anticuerpo terapéutico, con la consecuencia de la pérdida de eficacia, hasta la anafilaxia fatal en el caso más extremo.

Un procedimiento para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos monoclonales extraños ha consistido en reemplazar los dominios constantes de las cadena ligera y pesada del anticuerpo monoclonal por dominios análogos de origen humano manteniendo intactos los dominios de las regiones variables del anticuerpo extraño. Los dominios de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada son responsables de la interacción entre el anticuerpo y el antígeno. Los dominios de unión que conectan los dominios variables a los dominios constantes están ubicados en una región alejada del sitio de unión al antígeno y, por lo tanto, los dominios de unión entre los dominios variables y los constantes no interfieren, generalmente, en la unión al antígeno. Las moléculas de anticuerpos quiméricos que tienen dominios variables de ratón unidos a dominios constantes humanos se unen al antígeno, generalmente, con la misma constante de afinidad que el anticuerpo de ratón a partir del que se deriva el anticuerpo quimérico. Dichos anticuerpos quiméricos son menos inmunogénicos en humanos que sus equivalentes totalmente murinos. No obstante, los anticuerpos que conservan dominios variables murinos enteros tienden a provocar respuestas inmunitarias en una fracción sustancial de pacientes. Por ejemplo, INFLIXIMAB®, un anticuerpo recetado ampliamente que se considera seguro, induce una respuesta de anticuerpos anti-quiméricos humanos en 7 de cada 47 pacientes con enfermedad de Crohn. (Rutgeerts, P. y col (1999) Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (INFLIXIMAB) to maintain remission in Crohn's disease. Gastroenterology 117, 761-769).

El que los seres humanos producirían una respuesta inmunitaria a la totalidad de los dominios variables murinos era predecible; de este modo, los intentos de obtener dominios variables con un carácter más humano habían comenzado incluso antes de que se hubiera informado sobre los ensayos clínicos de dichos anticuerpos quiméricos estándar. Una categoría de procedimientos denominados frecuentemente "humanización" tienen el objetivo de convertir los dominios variables de anticuerpos monoclonales murinos en una forma más humana construyendo recombinantemente un dominio variable de anticuerpo que tenga un carácter tanto murino como humano. Los procedimientos de humanización se basan en distintas interpretaciones consensuadas de datos de estructuras de anticuerpos. Primeramente, los dominios variables contienen tramos contiguos de secuencias de péptidos que se

conservan dentro de una especie, pero que difieren entre especies evolucionariamente alejadas, tales como ratones y seres humanos. En segundo lugar, otros tramos contiguos no se conservan dentro de una especie, sino que también difieren incluso entre células productoras de anticuerpos dentro del mismo individuo. En tercer lugar, los contactos entre anticuerpo y antígeno tienen lugar principalmente a través de regiones no conservadas del dominio variable. En cuarto lugar, la arquitectura molecular de dominios variables de anticuerpos es lo suficientemente similar entre especies que las posiciones de los restos de aminoácidos correspondientes entre especies pueden identificarse solamente sobre la base de su posición, sin datos experimentales.

Los procedimientos de humanización comparten la premisa de que el reemplazo de restos de aminoácidos que son característicos de secuencias murinas por restos encontrados en las posiciones correspondientes de anticuerpos humanos reducirá la inmunogenicidad en seres humanos del anticuerpo resultante. No obstante, el reemplazo de secuencias entre especies da como resultado, generalmente, la reducción de la unión del anticuerpo a su antígeno. La técnica de la humanización se basa, por lo tanto, en equilibrar el reemplazo de la secuencia murina original para reducir la inmunogenicidad con la necesidad de que la molécula humanizada conserve una unión al antígeno suficiente como para ser terapéuticamente útil. Este equilibrio se ha conseguido usando dos enfoques.

En un enfoque, ejemplificado por medio del documento de patente de Estados Unidos Nº 5.869.619 de Studnicka y por Padlan (1991) A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand binding properties, *Molecular Immunology* 28:489-498, los restos humanos se sustituyen de forma característica por restos del dominio variable murino que se han determinado o predicho (i) para cumplir un papel químico poco importante en la interacción con el antígeno y (ii) para ubicarse con cadenas laterales que se proyectan en el disolvente. De este modo, los restos exteriores alejados del sitio de unión al antígeno están humanizados, mientras que los restos interiores, los restos de unión al antígeno y los restos que forman la interconexión entre dominios variables permanecen murinos. Una desventaja de este enfoque es que se requieren unos datos experimentales bastante amplios para determinar si un resto tiene un papel químico poco importante en la unión al antígeno o será ubicado en el disolvente en una estructura de anticuerpo particular de tres dimensiones.

En otro enfoque más general, ejemplificado por el documento de patente de Estados Unidos Nº 5.225.539 de Winter y por Jones y col. (1986) Replacing the complementarity determining regions in a human antibody with those from a mouse, *Nature* 321:522-525, tramos contiguos de la secuencia de péptidos del dominio variable murino que se consideran conservados se reemplazan por los tramos correspondientes de un anticuerpo humano. En este enfoque más general, todos los restos de los dominios variables están humanizados excepto en las regiones no conservadas implicadas en la unión al antígeno. Para determinar los tramos contiguos apropiados para el reemplazo, Winter y Jones y col. (1986) usaron una clasificación de secuencias de dominios variables de anticuerpos que habían sido desarrolladas previamente por Wu y Kabat (1970).

Wu y Kabat fueron pioneros en el alineamiento de secuencias de péptidos de anticuerpos y sus contribuciones al respecto fueron múltiples: En primer lugar, mediante el estudio de similitudes secuenciales entre dominios variables, identificaron los restos correspondientes que en mayor o menor medida eran homólogos en todos los anticuerpos de todas las especies de vertebrados, en cuanto a que adoptaban estructuras tridimensionales similares, tenían papeles funcionales similares, interactuaban de forma similar con restos adyacentes y existían en ambientes químicos similares. En segundo lugar, diseñaron un sistema de numeración de secuencias de péptidos en el que se asignó a los restos de inmunoglobulina homólogos el mismo número de posición. Un experto en la técnica puede asignar de forma no ambigua lo que actualmente se denomina numeración de Kabat a cualquier secuencia de un dominio variable sin depender de datos experimentales más allá de la secuencia en sí. En tercer lugar, para cada posición de la secuencia numerada según Kabat, Kabat y Wu calcularon la variabilidad, por medio de la cual se denota el hallazgo de pocos o muchos aminoácidos posibles cuando se alinean las secuencias de dominios variables. Identificaron tres regiones contiguas de alta variabilidad embebidas en cuatro regiones contiguas menos variables. Otros investigadores habían observado previamente variabilidad aproximadamente en estas regiones (regiones hipervariables) y habían postulado que las regiones de variabilidad alta representaban restos de aminoácidos que se usaban para la unión al antígeno. Kabat y Wu determinaron formalmente restos que constituían estos tramos variables y los denominaron "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR), con referencia a la complementariedad química entre anticuerpo y antígeno. A las regiones menos variables restantes, que actualmente se denominan "regiones estructurales", se les atribuyó un papel en el plegamiento tridimensional del dominio variable, pero no en el reconocimiento del antígeno. En cuarto lugar, Kabat y Wu establecieron una base de datos pública de secuencias de ácidos nucleicos y péptidos de anticuerpos que continúa manteniéndose y es bien conocida por los expertos en la técnica.

El procedimiento de humanización dado a conocer por Winter y Jones usando la clasificación de Kabat da como resultado un anticuerpo quimérico que comprende CDR de un anticuerpo y regiones estructurales de otro anticuerpo que difiere del primero en la especie de origen, especificidad, subclase u otras características. No obstante, no se atribuyeron secuencias o propiedades particulares a las regiones estructurales, es más, Winter enseñó que cualquier conjunto de estructuras podía combinarse con cualquier conjunto de CDR. Desde entonces se ha reconocido que las secuencias estructurales son importantes para conferir la estructura tridimensional de una región variable de un anticuerpo necesaria para mantener una buena unión al antígeno. De este modo, los procedimientos de humanización generales descritos por Winter y Jones tienen la desventaja de que producen frecuentemente

anticuerpos inactivos debido a que estas referencias no proporcionan la información necesaria para seleccionar racionalmente entre las muchas secuencias estructurales humanas posibles las que proporcionan con mayor probabilidad el sitio de unión requerido por una región CDR particular de un anticuerpo no humano. Los desarrollos subsiguientes en el sector han sido mejoras dentro del ámbito de Winter para tratar la pérdida de avidéz para antígenos observada en algunos anticuerpos humanizados con relación a la avidéz de los anticuerpos de ratón correspondientes. (La avidéz es la medida cuantitativa de la distribución de un anticuerpo en presencia de un antígeno, en condiciones aproximadas al equilibrio químico, entre formas libres y unidas al antígeno. Para reacciones en solución no sometidas a efectos de unión multivalentes, la avidéz es lo mismo que la afinidad, la constante de equilibrio bioquímica).

El documento de patente de Estados Unidos N° 5.693.761 de Queen y col., da a conocer una mejora sobre Winter para la humanización de anticuerpos que se basa en la premisa de que atribuye la pérdida de avidéz a problemas en motivos estructurales en la estructura humanizada, debido a una incompatibilidad estérica o de otro tipo químico, que interfiere en el plegamiento de las CDR en la conformación capacitada para la unión encontrada en el anticuerpo de ratón. Para solucionar este problema, Queen instruye sobre el uso de secuencias estructurales humanas estrechamente homólogas en la secuencia de péptidos lineal a las secuencias estructurales del anticuerpo de ratón que se va a humanizar. En consecuencia, los procedimientos de Queen se enfocan en comparar las secuencias estructurales entre especies. Típicamente, todas las secuencias disponibles de dominios variables humanos se comparan a una secuencia de ratón particular y se calcula el porcentaje de identidad entre los restos estructurales correspondientes. El dominio variable humano con el porcentaje más alto se selecciona para proporcionar las secuencias estructurales para el proyecto de humanización. Queen también enseña que es importante retener en la estructura humanizada determinados restos de aminoácidos de la estructura murina críticos para mantener las CDR en una conformación capacitada para la unión. La criticalidad potencial se evalúa a partir de modelos moleculares. Los restos candidatos para la retención son típicamente los adyacentes en secuencia lineal a una CDR o físicamente dentro de 6 Å de cualquier resto de CDR.

En otros enfoques, la criticalidad de restos de aminoácidos estructurales particulares se determina experimentalmente una vez se ha obtenido un constructo humanizado de baja avidéz, mediante reversión de restos individuales a la secuencia murina y analizando la unión al antígeno tal como describen Riechmann y col., (1988). Otro ejemplo de enfoque para identificar la criticalidad de aminoácidos en secuencias estructurales se da a conocer en el documento de patente de Estados Unidos N° 5.821.337 de Carter y col y en el documento de patente de Estados Unidos N° 5.859.205 de Adair y col. Estas referencias dan a conocer posiciones de restos de Kabat específicas en la estructura, lo que, en un anticuerpo humanizado puede requerir la sustitución por el aminoácido murino correspondiente para conservar la avidéz. Una de las desventajas de las mejoras de Queen, y de los enfoques de Riechmann, Carter y Adair, es que se requiere un número muy elevado de secuencias estructurales humanas para la comparación, y/o las instrucciones para conservar los restos de aminoácidos críticos no son totalmente suficientes para predecir la funcionalidad. En consecuencia, las estructuras resultantes construidas, que son en parte humanas y en parte murinas, muestran frecuentemente, todavía, inmunogenicidad humana o una unión al antígeno más reducida, por lo que se requieren numerosas iteraciones en construcción de estructuras para obtener una estructura adecuada para usos terapéuticos.

Un segundo tipo de mejora a Winter se ejemplifica por Padlan y col. (1995) Identification of specificity-determining residues in antibodies, FASEB J. 9:133-139; y Tamura y col. (2000) Structural correlates of an anti-carcinoma antibody: identification of specificity-determining residues (SDRs) and Development of a minimally immunogenic antibody variant by retention of SDRs only. J. Immunol. 164:1432-1441. Estas referencias comparten la premisa de que aumentando la proporción de la secuencia característicamente humana en un anticuerpo humanizado se reducirá la inmunogenicidad de dicho anticuepo y, en consecuencia, da a conocer procedimientos para injertar parcialmente secuencias de CDR. La determinación de la estructura de tres dimensiones de complejos anticuerpo-antígeno mostró que muchas posiciones de restos asignadas a las CDR definidas por Kabat y Wu raramente estaban implicados directamente en la unión al antígeno. Estas referencias mostraron que el injerto de un subconjunto de restos de CDR se transferiría adecuadamente a la unión al antígeno en un anticuerpo humanizado. No obstante, las secuencias estructurales humanizadas todavía se necesitan, y estas referencias no dan a conocer procedimientos para seleccionar secuencias estructurales humanas adecuadas para su uso con un conjunto dado de CDR de ratón.

WU H. Y COL.: 'Humanization of a murine monoclonal antibody by simultaneous optimization of framework and CDR residues' JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY vol. 294, 1999, páginas 151-162, da a conocer la humanización de un anticuerpo monoclonal murino mediante la optimización simultánea de restos estructurales y de CDR. Los autores generaron fragmentos Fab de anticuerpo que contenían sólo un resto estructural murino. Usando datos estructurales, los autores determinaron qué restos estructurales eran importantes para el mantenimiento de la afinidad de unión del anticuerpo murino y generando una colección combinatoria de variantes fueron capaces, a continuación, de seleccionar anticuerpos muy humanizados y con gran afinidad.

MHASHILKAR A.M. Y COL.: 'Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro in acutely and persistently infected human CD4+ mononuclear cells expressing murine and humanized anti-human immunodeficiency virus type 1 Tat single-chain variable fragment intrabodies' HUMAN GENE THERAPY vol. 10, 10

de junio de 1999, páginas 1453-1467, da a conocer intracuerpos ScFv humanizados para tat de VIH. Los fragmentos de anticuerpos se obtuvieron comparando el anticuerpo donante murino con las moléculasceptoras humanas potenciales y seleccionando el anticuerpo humano de una base de datos de secuencias de VH y VL humanas sobre la base de una alta coincidencia estructural general, longitud de CDR similar y la no coincidencia mínima de restos de contacto de VH/VL canónicas. Por lo tanto, todos los procedimientos de la técnica anterior requieren una comparación de secuencias estructurales.

Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de procedimientos para humanizar anticuerpos que identifiquen de forma fidedigna las secuencias estructurales humanas adecuadas para dar soporte a las regiones CDR no humanas y proporcionar anticuerpo humanizados que conserven una unión al antígeno alta con poca inmunogenicidad en humanos, sin la necesidad de una comparación directa de secuencias estructurales, sin necesidad de determinar restos de aminoácidos críticamente importantes en la estructura y sin la necesidad de una iteración múltiple en la construcción para obtener anticuerpos humanizados con propiedades terapéuticas adecuadas.

Sumario de la invención

La presente invención satisface esta necesidad proporcionando el procedimiento reivindicado en la reivindicación 1. Las realizaciones de la presente invención se reivindican en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención proporciona procedimientos para fabricar anticuerpos humanizados de alta afinidad y baja inmunogenicidad sin necesidad de comparar secuencias estructurales entre anticuerpos no humanos y humanos y también describe los anticuerpos humanizados fabricados mediante los mismos. En vez de basarse en secuencias estructurales humanas como punto de análisis, los procedimientos proporcionados en el presente documento se basan en la comparación de tipos de estructura canónica de CDR del anticuerpo no humano con tipos de estructura de CDR de anticuerpos humanos, en particular codificadas por secuencias de línea germinal humana, para identificar secuencias del anticuerpo humano candidato de las que se obtengan estructuras humanas apropiadas.

Más particularmente, se proporciona un procedimiento para fabricar anticuerpos humanizados que incluye las acciones de obtener una secuencia de péptidos para una región variable sujeto codificada por un gen de anticuerpo maduro no humano y de identificar un primer conjunto de tipos de estructuras canónicas de CDR para al menos dos CDR de la región variable del anticuerpo no humano. A continuación, se obtiene también una colección de secuencias de péptidos para regiones variables de anticuerpo humano para anticuerpos humanos. En una realización preferente, la colección contiene secuencias para regiones variables de línea germinal humana codificadas por segmentos de ácidos nucleicos de línea germinal. En otras realizaciones, no obstante, la colección puede incluir secuencias maduras de anticuerpo humano. En cualquier caso, el procedimiento incluye identificar tipos canónicos de estructuras de CDR (es decir, un segundo conjunto de tipos canónicos de estructuras de CDR) para al menos dos CDR para cada secuencia de la colección de secuencias de regiones variables humanas. A partir de esta colección se selecciona un subconjunto de secuencias candidatas comparando el primer conjunto de tipos canónicos de estructuras de CDR con un segundo conjunto de tipos canónicos de estructuras de CDR (es decir, comparando los tipos canónicos de estructuras de CDR con los tipos canónicos de estructuras de CDR en ubicaciones correspondientes dentro de la región variable) y seleccionando aquellas secuencias humanas en las que el segundo conjunto de estructuras canónicas de CDR es el mismo que el primer conjunto de tipos canónicos de estructuras de CDR en las ubicaciones correspondientes dentro de las regiones variables no humanas y humanas, respectivamente. El procedimiento usa estas secuencias de regiones variables humanas candidatas como base para construir una molécula quimérica que incluya al menos dos de las secuencias de CDR de la región variable no humana (por ejemplo, de las CDR de ratón) combinadas con las regiones estructurales de las secuencias de las regiones variables humanas candidatas. El resultado de la construcción es que el anticuerpo quimérico contiene cada una de las secuencias de las CDR no humanas sustituidas por cada una de las secuencias de las CDR humanas en las ubicaciones correspondientes en las regiones variables de tal modo que las secuencias estructurales del anticuerpo quimérico difieren de las secuencias estructurales humanas candidatas en no más de 10 restos de aminoácidos. En determinadas realizaciones, las secuencias estructurales del anticuerpo quimérico difieren de las secuencias estructurales humanas en no más de 5 restos de aminoácidos. En otras realizaciones, las secuencias estructurales del anticuerpo quimérico difieren de las secuencias estructurales humanas en no más de 2 restos de aminoácidos. En la mayor parte de las realizaciones, el acto de construir la molécula de anticuerpo quimérico incluye construir una secuencia de ácido nucleico que codifique las secuencias del anticuerpo quimérico.

En realizaciones típicas, el procedimiento incluye también ordenar los miembros del subconjunto de secuencias humanas candidatas comparando posición por posición la similitud de los restos de aminoácidos de las secuencias de CDR no humanas con las secuencias de CDR humanas correspondientes de acuerdo con un criterio de clasificación. En determinadas prácticas, el candidato de secuencias humanas incluye sólo el 25 % superior de la clasificación de los miembros. En algunas realizaciones, el criterio de clasificación incluye un registro de identidad de aminoácidos entre las secuencias de CDR no humanas y humanas en las posiciones de restos correspondientes de al menos una CDR, o al menos dos CDR, o, del modo más típico, de cada CDR correspondiente. En otras realizaciones, el criterio de clasificación incluye un registro de homología de aminoácidos entre las secuencias de CDR no humanas y humanas en las posiciones de restos correspondientes de al menos una, al menos dos, o de cada CDR correspondiente. En aún otra realización más, el criterio de clasificación incluye un registro de la identidad de aminoácidos y también un registro de la homología de aminoácidos para al menos una, al menos dos o cada una

de las correspondientes CDR. El procedimiento puede ponerse en práctica usando CDR tal como se definen mediante sistemas diferentes. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, las CDR son CDR definidas según Kabat; en otras realizaciones, las CDR son bucles de CDR definidos según Chothia.

5 El procedimiento no está limitado a usar estrictamente las secuencias de CDR exactas de la fuente no humano o las exactas de las estructuras humanas de los conjuntos de miembros. En determinadas realizaciones, el procedimiento puede incluir también la sustitución de al menos un resto de aminoácido de las secuencias de CDR no humanas por un aminoácido diferente, siempre que, no obstante, no se sustituyen más de 4 restos en cualquiera de entre la CDR1 de cadena ligera humana, CDR2 de cadena ligera, CDR3 de cadena ligera, CDR1 de cadena pesada o CDR3
10 de cadena pesada y no se sustituyan más de 10 aminoácidos en la CDR2 de cadena pesada no humana. En otras realizaciones, el procedimiento también puede incluir la sustitución de al menos un resto de aminoácido, pero no más de 10, de la secuencia estructural humana por un resto de aminoácido diferente.

15 El procedimiento también reconoce que en determinadas ocasiones la región variable no humana puede incluir una secuencia de CDR que tenga un tipo canónico ausente de las regiones variables humanas. En casos en los que cada una de las tres CDR no humanas es una CDR de cadena ligera, si una de las tres secuencias de CDR no humanas es de un tipo canónico de estructura ausente de la colección de secuencias de regiones variables humanas, la actuación de seleccionar las secuencias humanas incluye seleccionar una secuencia de región variable humana con una CDR de un tipo canónico diferente al tipo de CDR no humana ausente en la ubicación correspondiente, con la única condición de que el tipo canónico de CDR humana diferente tenga una longitud de no más de dos restos de aminoácidos mayor o menor que la longitud del tipo canónico de estructura CDR ausente de la CDR no humana. Típicamente, si las secuencias de la CDR ausente no son del tipo 1, la actuación incluye entonces seleccionar una secuencia humana con una CDR del tipo canónico 2 en la ubicación correspondiente, o si la secuencia de CDR no humana es del tipo canónico 5 entonces el acto incluye seleccionar una secuencia humana
25 con una CDR del tipo canónico 4 ó 3 en la ubicación correspondiente.

En la mayor parte de las reivindicaciones, la región variable no humana es una región variable de ratón. De modo similar, en la mayor parte de las reivindicaciones, la colección de secuencias de regiones variables humanas incluye una secuencia V_k , V_λ , V_H , J_H , J_k o J_λ humana como fuente de las estructuras humanas. En la mayor parte de las
30 reivindicaciones, el procedimiento incluye ensamblar un anticuerpo quimérico que tenga tanto una cadena ligera variable quimérica como una cadena pesada variable quimérica, típicamente con estructuras humanas de secuencias V_k y V_H . En realizaciones típicas, las cadenas ligeras variables quiméricas y las cadenas pesadas variables quiméricas están formadas por un fragmento Fab, o una molécula $(Fab)_2$, o una molécula Fv de cadena simple, o las cadenas ligeras variables quiméricas y las cadenas pesadas quiméricas están ensambladas con una
35 región constante de anticuerpo humano formando un anticuerpo completo.

Los procedimientos son aplicables a convertir una secuencia de anticuerpo sujeto de cualquier especie sujeto en una forma menos inmunogénica adecuada para su uso en una especie objeto fabricando anticuerpos quiméricos que contienen secuencias estructurales de la especie objeto en combinación con CDR de la especie sujeto. En tales
40 casos, los procedimientos precedentes son los mismos en cuanto a las acciones realizadas, en los que la región variable puede ser de cualquier especie sujeto y la región variable objeto puede ser de cualquier especie objeto para la que se use el anticuerpo. De este modo, por ejemplo, en varias realizaciones, un anticuerpo sujeto puede quimerizarse con secuencias estructurales de fuentes bovinas, porcinas, murinas o equinas para formar un anticuerpo bovinizado, porcino, murino o equino, respectivamente.

45 Las composiciones pueden fabricarse de modo que incluyan las moléculas de anticuerpo quimérico fabricadas de acuerdo con los procedimientos desvelados. Los procedimientos de la presente invención proporcionan un anticuerpo humanizado que incluye una región variable de anticuerpo quimérica que contiene al menos dos secuencias de CDR no humanas condensadas adyacentes a la secuencia estructural de la región variable humana. Las secuencias estructurales humanas se seleccionan a partir de un subconjunto de secuencias estructurales
50 caracterizadas por tener no más de 10 restos de aminoácidos que difieren de una secuencia estructural en una región variable de anticuerpo humano que tiene al menos dos secuencias de CDR humana con el mismo tipo canónico de estructura que las secuencias de CDR no humanas para al menos dos posiciones de CDR correspondientes entre la región variable del anticuerpo quimérico y del anticuerpo humano.

55 Las CDR de regiones variables no humanas son típicamente de ratón. La secuencia de región variable humana es típicamente una secuencia V_k , V_λ , V_H , J_H , J_k o J_λ . Del modo más típico, el anticuerpo quimérico incluye secuencias de anticuerpo quimérico para una cadena ligera variable y una cadena pesada variable. Más típicamente, las cadenas ligeras variables quiméricas y las cadenas pesadas variables quiméricas están formadas por un fragmento Fab, o una molécula $(Fab)_2$, o una molécula Fv de cadena simple, o las cadenas ligeras variables quiméricas y las cadenas pesadas quiméricas están ensambladas con una región constante de anticuerpo humano formando un anticuerpo completo. Del modo más típico, la secuencia de la región variable humana es una secuencia de un fragmento de región variable de línea germinal humana. Además, la secuencia de regiones variables humanas puede ser una secuencia de un anticuerpo maduro humano.

65 Preferentemente, el anticuerpo humanizado tiene una constante de disociación para su antígeno de al menos 10^6 M

¹, más preferentemente de al menos $10^7 M^{-1}$ y aún más preferentemente de al menos $10^8 M^{-1}$. Típicamente, el anticuerpo humanizado no provoca una respuesta inmunitaria cuando se administra a un ser humano. Realizaciones particulares incluyen anticuerpos humanizados que se unen a antígeno de veneno de escorpión, que se unen al receptor CD28 humano, que se unen a lisozimas humanos o que se unen a ácido glutámico-descarboxilasa (GAD65) humana.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa una colección de segmentos génicos de V_H de línea germinal humana.

La figura 2 representa una colección de segmentos génicos de V_k de línea germinal humana.

La figura 3 representa una porción de secuencia de cadena ligera variable de anticuerpo de D1.3 (lisozoma antipollo) murino y un subconjunto seleccionado de las secuencias de región variable de V_k de línea germinal humana que tienen CDR canónicas del mismo tipo que la secuencia de cadena ligera de DL.3 de ratón en las ubicaciones correspondientes. El subconjunto está clasificado por similitud de secuencias de aminoácidos entre las CDR de DL.3 y las CDR humanas, con la secuencia clasificada como superior representada en primer lugar.

La figura 4 representa una porción de secuencia de cadena pesada variable de anticuerpo D1.3 de ratón y un subconjunto seleccionado de secuencias de regiones variables de V_H de línea germinal humana que tiene CDR canónicas del mismo tipo que el DL.3. El subconjunto está clasificado por similitud de secuencias de aminoácido de las CDR correspondientes de forma análoga a la figura 3.

La figura 5 representa secuencias de aminoácidos para una región variable de V_k quimérica y una región variable de V_H para un anticuerpo D1.3 humanizado, que ilustra un aspecto de la invención.

La figura 6 representa una secuencia de ácido nucleico para un constructo de ADN que codifica (y expresa) el anticuerpo D1.3 quimérico humanizado de la figura 5, que ilustra otro aspecto de la invención.

La figura 7 es un gráfico que ilustra la unión de antígeno al anticuerpo D1.3 humanizado, que tiene una constante de afinidad superior a $10^8 M^{-1}$, que ilustra una realización de la invención.

La figura 8 representa una porción de una secuencia de cadena ligera variable de ratón de un anticuerpo CD28 antihumano denominado 9.3 y un subconjunto seleccionado de secuencias de regiones variables de V_k de línea germinal humana que tiene CDR canónicas del mismo tipo que la secuencia de cadena ligera variable 9.3 de ratón en las ubicaciones correspondientes, que están clasificadas por similitud de secuencias de aminoácidos de forma análoga a la figura 3.

La figura 9 representa una porción de la secuencia de cadena pesada variable de ratón para el anticuerpo 9.3 y un subconjunto seleccionado de secuencias de región variable de línea germinal V_H humana que tiene CDR canónicas del mismo tipo que la secuencia de cadena pesada variable de ratón en ubicaciones correspondientes ordenadas también por similitud de secuencias de aminoácidos.

La figura 10 representa un fragmento FAb de CD28 (Hu.9.3) antihumano con cadenas ligeras variables y pesadas variables quiméricas que ilustra otra realización de la invención.

La figura 11 es un gráfico que ilustra la unión de antígeno al fragmento Fab de Hu9.3, que tiene una constante de afinidad superior a $10^6 M^{-1}$, que ilustra una realización de la invención.

La figura 12 representa un fragmento Fab de toxina antiescorpión humanizado con cadenas ligeras variables y pesadas variables quiméricas que ilustra otra realización de la invención.

La figura 13 representa un fragmento FAb de ácido glutámico-descarboxilasa (GAD65) antihumano con cadenas ligeras variables y pesadas variables quiméricas que ilustra otra realización de la invención.

La figura 14 es un gráfico que ilustra la unión de antígeno al fragmento Fab antiGAD65 humanizado, que tiene una constante de afinidad superior a $10^{11} M^{-1}$, que ilustra una realización de la invención.

Descripción detallada de la invención

En la descripción siguiente, se realiza una mención a varias referencias que pueden ayudar a un experto en la técnica a comprender y a poner en práctica la invención en su extensión más completa. Por lo tanto, cada referencia que se cita en la descripción en adelante se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad. Para ayudar a entender mejor varias realizaciones de la invención puede ser útil explicar el significado de determinados términos que se usan en el presente documento.

Un "gen de anticuerpo maduro" es una secuencia genética que codifica una inmunoglobulina que se expresa, por ejemplo, en un linfocito tal como un linfocito B, en un hibridoma o en cualquier célula productora de anticuerpos que ha experimentado un proceso de maduración de tal modo que se expresa la inmunoglobulina particular. El término incluye la secuencia genómica madura, de ADNc o de otro ácido nucleico que codifique dichos genes maduros que haya sido aislada y/o diseñada recombinantemente para la expresión en otros tipos de células. Los genes de anticuerpo maduro han experimentado varias mutaciones y reordenamientos que los distinguen estructuralmente de genes de anticuerpo codificados en todas las células distintas a los linfocitos. Los genes de anticuerpo maduro en seres humanos, roedores y muchos otros mamíferos se forman mediante fusión de segmentos génicos V y J en el caso de cadenas ligeras de anticuerpos de genes V, D y J en el caso de cadenas pesadas de anticuerpos. Muchos genes de anticuerpo maduro adquieren mutaciones puntuales después de la fusión, algunos de los cuales aumentan la afinidad de la proteína del anticuerpo por un antígeno específico.

"Genes de anticuerpo de línea germinal" o fragmentos génicos son secuencias de inmunoglobulina codificadas por células no linfoides que no han experimentado el proceso de maduración que conduce a reordenamiento genético y mutación para la expresión de una inmunoglobulina particular. Una de las ventajas proporcionadas por varias realizaciones de la presente invención se deriva del reconocimiento de que los genes de anticuerpo de línea germinal es más probable que conserven estructuras de secuencias de aminoácidos esenciales características de individuos de la especie animal que los genes de anticuerpos maduros, por lo que es menos probable que se reconozcan como de una fuente extraña cuando se usan terapéuticamente en esas especies. La figura 1 y la figura 2 muestran secuencias de péptidos para genes de anticuerpos de líneas germinales humanas que codifican anticuerpos de región pesada variable (V_H) y de región ligera variable (V_L) humana (por ejemplo, inmunoglobulinas). Cada una de estas listas de secuencias ejemplifica una colección de genes de anticuerpos humanos, en particular una colección de genes de anticuerpos de línea germinal humana.

"Una CDR" es la región determinante de la complementariedad dentro de secuencias variables de un anticuerpo. Existen tres CDR en cada una de las secuencias pesadas variables y ligeras denominadas CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las regiones variables. Los límites exactos de estas CDR se han definido de forma diferente según sistemas diferentes, no obstante, todos tienen restos superpuestos en los que se constituyen las denominadas "regiones hipervariables" dentro de secuencias variables. El sistema descrito por Kabat (CITE) no sólo proporciona un sistema de numeración de restos no ambiguo que puede aplicarse a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporciona límites de restos precisos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse CDR de Kabat. Chothia y sus colaboradores (CITE) descubrieron que determinadas subporciones dentro de las CDR de Kabat adoptan conformaciones de esqueleto de péptidos casi idénticas, a pesar de tener una gran diversidad en los niveles de la secuencia de aminoácidos. Estas subporciones se denominaron L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3, denominando "L" y "H" las regiones de cadena ligera y de cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse CDR de Chothia, que tienen límites que se solapan con las CDR de Kabat. La tabla I ilustra el solapamiento de CDR de Chotia y de Kabat de acuerdo con el sistema de numeración de restos de Kabat.

40 TABLA I

Cadena	CDR	Kabat	Chotia
Ligera	CDR1	24 - 34	26 - 32
"	CDR2	50 - 56	50 - 52
"	CDR3	89 - 96	91 - 96
Pesada	CDR1	31 - 35	26 - 32
"	CDR2	50 - 65	52 - 56
"	CDR3	95 - 102	no definida de forma única

Otros límites que definen CDR que se solapan con CDR de Kabat se han descrito por Padlan (1995) o MacCallum (1996). Otras definiciones más de límites de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas anteriores, pero, sin embargo, se solaparán con las CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse mediante la predicción o los hallazgos experimentales de que restos particulares o grupos de restos o incluso CDR enteras no influyen significativamente en la unión al antígeno. Los procedimientos que se usan en el presente documento usan CDR definidas según cualquiera de estos sistemas, aunque realizaciones preferentes usan CDR definidas por Kabat o Chotia.

"Estructura" o "secuencia estructural" son las secuencias restantes de una región variable menos las CDR. Debido a que la definición exacta de una secuencia de CDR puede determinarse por medio de sistemas diferentes, el significado de un secuencia estructural es sujeto de interpretaciones correspondientemente diferentes. Para aclarar el significado que se usa en el presente documento, una secuencia estructural significa las secuencias de una región

variable de un anticuerpo diferentes de las definidas como secuencias CDR, de tal modo que la secuencia exacta de una estructura depende sólo de como se define la CDR. Por ejemplo, las CDR que se usan en los procedimientos que se proporcionan en el presente documento son generalmente un subconjunto de lo que se considera una CDR de Kabat, pero en el caso de la CDR1 de cadenas pesadas, por ejemplo, también incluye restos que están clasificados como restos estructurales en el sistema de Kabat.

"Tipos canónicos de estructura de CDR" son los tipos estructurales designados por Chothia (CITE). Chothia y sus colaboradores descubrieron que porciones críticas de las CDR de muchos anticuerpos adoptan conformaciones de esqueleto de péptidos casi idénticas, a pesar de tener una gran diversidad en los niveles de la secuencia de aminoácidos. En consecuencia, Chothia definió para cada CDR en cada cadena una o unas pocas "estructuras canónicas". Cada estructura canónica especifica principalmente un conjunto de ángulos de torsión de esqueleto peptídico para un segmento contiguo de restos de aminoácidos formando un bucle. Los tipos canónicos de estructura de CDR definidos por Chothia se enumeran en la tabla II.

TABLA II:

Cadena	CDR	Tipos canónicos de estructura
Kappa	CDR1	1 - 6
"	CDR2	1
"	CDR3	1 - 6
Pesada	CDR1	1 - 3
"	CDR2	1 - 4
Lambda	CDR1	1 - 4
Lambda	CDR2	1
"	CDR3	1 - 2

"CDR de correspondencia" se refiere relativamente a las CDR entre dos secuencias variables diferentes que se corresponden en posición dentro de dos secuencias variables diferentes. De este modo, por ejemplo, una CDR1 de cadena ligera de ratón se corresponde con una CDR1 de cadena ligera humana y viceversa, debido a que cada una cartografía una posición definida en el sistema de numeración de Kabat, estando el límite real de la CDR definido o no por Kabat, Chothia o algún otro sistema. De modo similar, restos, secuencias o aminoácidos "de correspondencia" se refiere relativamente a las posiciones de los restos entre dos secuencias de péptidos diferentes cartografiadas por el sistema de numeración de Kabat.

El objetivo de los procedimientos que se proporcionan en el presente documento, que pueden denominarse procedimiento de injerto de CDR, es proporcionar una indicación para lograr una secuencia estructural humana apropiada para la humanización de un anticuerpo no humano sujeto. En todos los procedimiento de injerto de CDR previos, la elección de la secuencia estructural humanizada se basa en la comparación de la estructura humana con las estructuras sujeto (murinas). Por el contrario, la base de los procedimientos que se describen en el presente documento son para seleccionar el anticuerpo humano para proporcionar la estructura humanizada basada en la similitud de sus CDR con las del anticuerpo sujeto, sin tener en cuenta la comparación de las secuencias estructurales entre los dos anticuerpos.

La similitud de las CDR sujeto de secuencias de anticuerpo humano candidato se evalúa para cada dominio en dos niveles. En primer lugar, se buscan conformaciones tridimensionales idénticas de esqueletos peptídicos. Los coordinados atómicos determinados experimentalmente de las CDR sujeto están disponibles raramente, por lo que la similitud tridimensional se aproxima determinando tipos canónicos de estructura de Chothia de las CDR sujeto y excluyendo de posteriores consideraciones candidatos que poseen estructuras canónicas diferentes. En segundo lugar se considera la homología resto a resto entre las CDR sujeto y las CDR candidatas humanas restantes, y se elige el candidato con la homología más alta.

La elección de homología más alta se basa en diversos criterios que se usan para clasificar las regiones variables humanas candidatas que tienen la misma estructura canónica como las regiones variables humanas sujeto. Los criterios de clasificación de los miembros del conjunto seleccionado pueden ser por identidad de secuencia de aminoácidos u homología de aminoácidos o ambas. La identidad de aminoácidos es simplemente un registro de la posición mediante similitudes de posición de restos de aminoácidos. La similitud por homología de aminoácidos es la similitud posición a posición en estructura de carácter de restos. La homología puede registrarse, por ejemplo, de acuerdo con las tablas y procedimientos descritos por Henikoff y Henikoff, (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks, Proc. Natl. Acad. Sci 89: 10915-10919, o por la serie BLOSUM descrita por Henikoff y Henikoff, (1996).

Las etapas de los procedimientos son las siguientes:

- 5 Determinar las secuencias de péptidos de los dominios variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo sujeto. Éstas pueden determinarse mediante cualquiera de entre varios procedimientos, tales como la secuenciación de los genes respectivos después de una clonación de ADNc convencional, secuenciación de ADN de productos de clonación que se han amplificado por medio de la reacción en cadena de la polimerasa a partir de transcritos inversos o ADN de la línea de hibridoma sujeto, o secuenciación de péptidos de una proteína de anticuerpo purificada.
- 10 Aplicar el sistema de numeración de Kabat (Kabat y col., 1991) a las secuencias de cadena pesada y ligera del anticuerpo no humano sujeto.
- 15 Determinar los tipos canónicos de estructura para cada una de las CDR del anticuerpo no humano sujeto. Esta determinación se realiza a partir del examen de la secuencia de péptidos siguiendo las directrices expuestas por Chothia y Lesk (1987), Chothia y col. (1992), Tomlinson y col. (1995), Martin y Thornton (1996) y Al-Lazikani y col. (1997). Los aspectos notables de la determinación de estructuras canónicas para cada una de las CDR son los siguientes.
- 20 Para la CDR1 de cadena pesada, se conocen actualmente tres tipos canónicos de estructura. La asignación de una secuencia nueva es sencilla debido a que cada tipo canónico de estructura tiene un número diferente de restos. Tal como se describe en Al-Lazikani y col. (1997), cuando se asigna la numeración de Kabat a la secuencia, la numeración para los restos 31 - 35 será como sigue para las estructuras canónicas respectivas.
- 25 Estructura canónica de tipo 1: 31, 32, 33, 34, 35.
Estructura canónica de tipo 2: 31, 32, 33, 34, 35, 35a.
Estructura canónica de tipo 3: 31, 32, 33, 34, 35, 35a, 35b.
- 30 Para la CDR2 de cadena pesada, se conocen actualmente cuatro tipos canónicos de estructura. Muchas tienen números únicos de restos, y se distinguen fácilmente por su numeración de Kabat única de posiciones 52 - 56, es decir:
- 35 Estructura canónica de tipo 1: 52, 53, 54, 55, 56.
Estructura canónica de tipo 4: 52, 52a, 52b, 52c, 53, 54, 55, 56.
- 40 Los tipos 2 y 3 de estructuras canónicas para la CDR2 de cadena pesada tienen el mismo número de restos, por lo que deben distinguirse por indicios dentro de sus secuencias, tal como se expone por Chothia y col. (1992). La numeración de Kabat del segmento que contiene estos indicios es: 52, 52a, 53, 54, 55. La estructura canónica de tipo 2 tiene Pro o Ser en posición 52a y Gly o Ser en posición 55, con ninguna restricción en las otras posiciones. El tipo 3 de estructura canónica tiene Gly, Ser, Asn, o Asp en la posición 54, con ninguna restricción en las otras posiciones. Estos criterios son suficientes para resolver la asignación correcta en la mayor parte de los casos. Adicionalmente, el resto estructural 71 es comúnmente Ala, Val, Leu, Ile o Thr para el tipo 2 de estructura canónica y comúnmente Arg para el tipo 3 de estructura canónica.
- 45 La CDR3 de cadena pesada es la más diversa de todas las CDR. Se genera mediante procesos genéticos, algunas de naturaleza aleatoria, únicas para linfocitos. En consecuencia, las estructuras canónicas para la CDR3 han sido difíciles de predecir. En algunos casos, los segmentos génicos V de línea germinal humana no codifican ninguna parte de la CDR3, debido a que los segmentos finalizan en la posición de Kabat 94, mientras que las posiciones 95 a 102 codifican la CDR3. Por estas razones, las estructuras canónicas de CDR3 no se consideran para elegir secuencias humanas candidatas.
- 50 Para CDR1 de cadena ligera, se conocen actualmente seis tipos de estructura canónica para CDR1 en cadenas kappa. Cada tipo de estructura canónica tiene un número diferente de restos, por lo que las asignaciones de una tipo de estructura canónica a una secuencia nueva es aparente a partir de la numeración de Kabat de las posiciones de restos 27 - 31.
- 55 Estructura canónica de tipo 1: 27, 29, 30, 31.
Estructura canónica de tipo 2: 27, 28, 29, 30, 31.
Estructura canónica de tipo 3: 27, 27a, 27b, 27c, 27d, 27e, 27f, 28, 29, 30, 31.
60 Estructura canónica de tipo 4: 27, 27a, 27b, 27c, 27d, 27e, 28, 29, 30, 31.
Estructura canónica de tipo 5: 27, 27a, 27b, 27c, 27d, 28, 29, 30, 31.
Estructura canónica de tipo 6: 27, 27a, 28, 29, 30, 31.
- 65 Para la CDR2 de cadena ligera, sólo se conoce un único tipo de estructura canónica para CDR2 en cadenas lambda, por lo que, con la excepción de secuencias de anticuerpo sujeto excepcionales, la asignación es automática

Para la CDR3 de cadena ligera, se han descrito hasta seis tipos de estructura canónica para CDR3 en cadenas kappa, pero tres de ellas son raras. Las tres comunes pueden distinguirse por su longitud, reflejada en la numeración de Kabat de las posiciones de restos 91 - 97:

- 5 Estructura canónica de tipo 1: 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 (también con una Pro obligatoria en la posición 95 y Gln, Asn o His en la posición 90).
 Estructura canónica de tipo 3: 91, 92, 93, 94, 95, 97.
 Estructura canónica de tipo 5: 91, 92, 93, 94, 95, 96, 96a, 97.

10 Después de identificar los tipos canónicos de estructura de CDR del anticuerpo no humano sujeto, los genes humanos del mismo tipo de cadena (pesada o ligera) que tienen la misma combinación de tipos de estructura canónica que el anticuerpo sujeto se identifican para formar un conjunto candidato de secuencias humanas. En realizaciones preferentes sólo se consideran para la comparación las secuencias de péptidos de fragmentos génicos V_H y V_k de inmunoglobulina de línea germinal humana. La mayor parte de estos fragmentos génicos han sido descubiertos y han sido asignados a un tipo de estructura canónica (Chothia y col., 1992, Tomlinson y col., 1995).
 15 Entre las secuencias enumeradas en la figura 1 y en la figura 2 aparecen fragmentos génicos V adicionales no dados a conocer por estas referencias y que se proporcionan en el presente documento. Para la cadena pesada, se evalúa la conformidad de la CDR1 y la CDR2 con los tipos de estructura canónica de ratón, y se excluyen los genes que no conforman. Para la cadena ligera, se evalúa primeramente la conformidad de la CDR1 y la CDR2 de cada
 20 secuencia humana con los tipos de estructura canónica del anticuerpo sujeto. El potencial de restos 89-95 de un gen V_k candidato para formar una CDR3 del mismo tipo de estructura canónica que el anticuerpo sujeto se evalúa situando una fusión del gen con una región J y aplicando criterios para la determinación del tipo de estructura de CDR canónica para la CDR3 con la secuencia fusionada y se excluyen las secuencias de no conformidad.

25 En otra realización, apropiada cuando un dominio variable de un anticuerpo sujeto es de un tipo de estructura canónica no disponible en el genoma humano, se consideran para la comparación genes V de línea germinal humana que tienen similar tridimensionalidad, pero no idéntica, los tipos de estructura de estructura canónica. Dicha circunstancia ocurre a menudo con la CDR1 de cadena kappa en anticuerpo murinos, incluidos dos de los ejemplos descritos más adelante. Todos los 6 tipos de estructura canónica posibles se han observado en esta CDR en
 30 anticuerpos murinos, mientras que el genoma humano codifica sólo los tipos canónicos 2, 3, 4 y 6. En estas circunstancias, un tipo de estructura de CDR canónico que tiene una longitud de restos de aminoácidos puede seleccionarse para la comparación de entre dos de la longitud de los restos de aminoácidos de la secuencia no humana sujeto. Por ejemplo, cuando un tipo 1 de estructura canónica se encuentra en el anticuerpo sujeto, deberían usarse para la comparación las secuencias V_k humanas con el tipo 2 de estructura canónica. Por ejemplo, cuando
 35 un tipo 5 de estructura canónica se encuentra en el anticuerpo murino, deberían usarse para la comparación las secuencias V_k humanas con el tipo 3 ó 4 de estructura canónica.

En otra realización, pueden considerarse para la comparación de secuencias secuencias de anticuerpo humano reordenado maduro. Dicha consideración puede garantizarse en una variedad de circunstancias, incluidas pero no limitadas a instancias en las que la secuencia humana madura (1) es muy cercana a la línea germinal, (2) se sabe que no es inmunogénica en humanos; o (3) contiene un tipo de estructura canónica idéntico al del anticuerpo sujeto, pero no se encuentra en la línea germinal humana.

45 En realizaciones preferentes, para cada uno de los genes V candidatos con tipos de estructura canónica similares, la identidad de secuencias resto y/o la homología con la secuencia sujeto se evalúan también para clasificar las secuencias humanas candidatas. En una realización específica, los restos evaluados son tal como sigue:

Cadena	CDR	Posiciones de restos
Kappa	1	26 - 32
"	2	50 - 52
"	3	91 - 96
Pesada 1	1	31 - 35
"	2	50 - 60

50 En realizaciones preferentes, la homología resto a resto se registra primeramente por el número de restos de aminoácidos idénticos entre el sujeto y las secuencias humanas candidatas. La secuencia humana que se usa para la construcción subsiguiente de un anticuerpo convertido se elige de entre el 25 por ciento de los candidatos con los mayores registros. En otras realizaciones, apropiadas cuando las secuencias candidatas tienen registros similares de identidad, puede considerarse adicionalmente la similitud entre restos de aminoácidos no idénticos. Las
 55 coincidencias alifático con alifático, aromático con aromático, o polar con polar entre restos sujeto y objeto se añaden a los registros. En otra realización, la evaluación cuantitativa de homología de secuencia puede realizarse

usando matrices de sustitución de aminoácidos tales como la matriz BLOSUM62 de Henikoff y Henikoff (1992).

Una secuencia objeto para el extremo C terminal de la región estructural para la secuencia de la CDR3 se selecciona a partir del conjunto de segmentos J de línea germinal humana conocidos. Una secuencia de péptidos J preferente se selecciona evaluando la homología resto a resto para cada segmento J para posiciones de secuencia para las que se solapan CDR3 y J, usando los criterios de registro especificados para la evaluación de genes candidatos V tal como se ha mencionado anteriormente. La secuencia de péptidos de segmento génico J que se usa para la construcción subsiguiente de un anticuerpo convertido se elige de entre el 25 por ciento de los candidatos con los registros superiores.

En una realización, la cadena variable quimérica contiene al menos dos CDR de la secuencia no humana sujeto, y secuencias estructurales de la secuencia humana candidata. En otras realizaciones, la cadena ligera quimérica contiene al menos tres CDR de la secuencia no humana sujeto, y secuencias estructurales de la secuencia humana candidata. En otras realizaciones, una cadena pesada quimérica contiene al menos dos CDR de la cadena pesada sujeto y secuencias estructurales de la cadena pesada humana candidata. En otra realización, una cadena pesada quimérica contiene al menos dos CDR de la cadena pesada sujeto y las secuencias estructurales de la cadena pesada humana candidata. En otra realización, una cadena pesada de anticuerpo quimérico contiene las CDR 1 y 2 de la secuencia humana no sujeto y los restos 50-60 para CDR3 y los restos 61-65 de una CDR de la cadena pesada humana, además de las secuencias estructurales de la secuencia humana candidata. En otra realización, una secuencia de cadena pesada quimérica contiene cada una de las CDR de la secuencia no humana sujeto, secuencias estructurales 27-30 de la secuencia sujeto y las secuencias estructurales de las secuencias candidatas. En todos los casos, no obstante, la molécula de anticuerpo quimérico contiene no más de 10 restos de aminoácidos en la secuencia estructural que difieren de los de la secuencia estructural de la región variable humana candidata.

En otra realización, apropiada cuando se desea un aumento de la afinidad de un anticuerpo humanizado, pueden sustituirse adicionalmente restos de de la CDR de un anticuerpo convertido por otros aminoácidos. Típicamente, no se cambian más de cuatro restos de aminoácidos de una CDR y, del modo más típico, no se cambiarán más de dos restos de la CDR, excepto para la CDR2 de cadena pesada, en la que pueden cambiarse hasta 10 restos. De modo similar, en determinadas realizaciones, pueden cambiarse algunos de los aminoácidos de las secuencias estructurales. En todas las realizaciones, no se cambian más de 10 restos de aminoácidos.

La secuencia de anticuerpo humanizada se ensambla a continuación físicamente mediante procedimientos de síntesis génica y de expresión de proteínas recombinantes conocidos por los expertos en la técnica. La forma final de las secuencias humanizadas que tienen las cadenas variables quiméricas fabricadas mediante los procedimientos divulgados en el presente documento puede tomar varias formas. Del modo más típico, los anticuerpos quiméricos se fabricarán mediante la construcción de una secuencia de ácido nucleico que codifique las cadenas variables quiméricas, que se expresan recombinantemente en un tipo de célula adecuado. Una de las formas más típicas de los anticuerpo quiméricos será un fragmento de anticuerpo Fab. Otras formas adecuadas del anticuerpo quimérico incluyen la molécula (Fab)₂ o una molécula Fv de cadena sencilla. Otras formas más pueden incluir además la fusión dando dominios constantes de un anticuerpo humano para formar un anticuerpo completo. En realizaciones preferentes, las cadenas variables ligera y pesada se humanizan. No obstante, en otra realización, las cadenas ligera y pesada variables pueden ser mixtas, es decir, con una cadena variable de ratón completa (o la pesada o la ligera), siendo la otra una cadena variable humanizada.

En la mayor parte de las reivindicaciones, el procedimiento incluirá el cribado de anticuerpo quiméricos candidatos para seleccionar los que tengan una constante de disociación por el antígeno adecuada para el uso pretendido. En la mayor parte de las realizaciones, el anticuerpo humanizado fabricado de acuerdo con estos procedimientos tendrá una constante de disociación de al menos aproximadamente 10^6 M^{-1} , al menos aproximadamente 10^7 M^{-1} o al menos aproximadamente 10^8 M^{-1} . Una Kd de al menos aproximadamente 10^8 M^{-1} es preferente para la mayor parte de los usos terapéuticos.

Los ejemplos siguientes ilustran la presente invención mostrando realizaciones específicas para anticuerpo humanizados que se unen a tipos diferentes de antígenos con fines de ilustración. Un experto en la técnica entenderá que pueden crearse muchas otras realizaciones específicas usando los procedimientos dados a conocer en el presente documento y que la presente invención no está limitada por los ejemplos específicos.

Ejemplo 1

Lisozima antipollo humanizada

El anticuerpo D1.3 de ratón se une a un antígeno lisozima de pollo. La secuencia de péptidos de los dominios variables de D1.3 se obtuvo del Banco de datos de proteínas, número de acceso 1VFA. La cadena ligera se numeró de acuerdo con Kabat y a las CDR de ratón se les asignaron tipos de estructura canónica tal como sigue:

La CDR1 de cadena ligera, numerada según Kabat, consiste en la secuencia:

24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34

R A S G N I H N Y L A

Debido a que no hay inserciones ni deleciones entre los restos 27 y 31, la CDR1 tiene una estructura canónica de tipo 2.

5

La CDR2 de cadena ligera, numerada según Kabat, consiste en la secuencia:

50 51 52 53 54 55 56

Y T T T L A D

10

Ésta no es una secuencia excepcional, su tipo de estructura canónica es el tipo 1.

La CDR3 de cadena ligera, numerada según Kabat, consiste en la secuencia:

89 90 91 92 93 94 95 96 97

Q H F W S T P R T

15

Debido a la longitud y a la Pro en la posición 95, está secuencia es consecuente con la estructura canónica de tipo 1.

20

En la compilación de la figura 2 y en Tomlinson y col. (1995), 21 genes Vk de línea germinal humana no redundante codifican (1) la CDR1 con el tipo 2 de estructura canónica, (2) la CDR2 con el tipo 1 de estructura canónica y (3) una secuencia con el potencial para formar el tipo 1 de estructura canónica en la CDR3. Están enumeradas en la figura 3 en la secuencia Vk de D1.3. Sus secuencias en las posiciones de los restos que comprenden los tipos de estructura canónica de Chothia también se proporcionan, y los genes Vk humanos en la figura 3 se estratifican según el número de identidades resto a resto en estas secuencias. La L23 tiene 7 identidades, mientras que las tres entradas siguientes de la lista tienen 6. Además, la L23 ha conservado las posiciones de restos 91 y 92, dentro de la CDR3, de nuevo superiores a las siguientes tres candidatas. La L23, por lo tanto, se elige para la construcción de humanización.

25

30

Entre los segmentos Jk humanos de la figura 3, ninguno coincide con la Arg en D1.3 en la posición 96, y todos son idénticos en las tres posiciones siguientes. El Jk4, que replica el motivo GGG en D1.3 en las posiciones 99-101, es el que mejor coincide para el segmento J y se usa para la construcción de humanización.

35

El dominio variable de cadena pesada de D1.3 se numeró según Kabat, tal como muestra la figura 4. A las CDR se les asignaron tipos de estructura canónica tal como sigue.

La secuencia en la región de cadena pesada CDR1 es

27 28 29 30 31 32 33 34 35

F S L T G Y G V N

40

Esta secuencia carece de residuos insertados, por lo que se le asigna una estructura canónica de tipo 1.

La CDR2 de Kabat de D1.3 tiene la secuencia

50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65

M I W G D G N T D Y N S A L K S

45

Debido a que no hay inserciones entre los restos 52 y 56, a la CDR2 se le asigna una estructura canónica de tipo 1. Los genes VH de línea germinal humana que se ha predicho que tienen una estructura canónica de tipo 1 en la CDR1 y una estructura canónica de tipo 1 en la CDR2 están tomadas de Chothia y col. (1992) y la figura 1, y se enumeran en la figura 4.

50

Los segmentos elegidos para la evaluación de homología fueron 27 - 35, correspondientes a la CDR1 de Kabat más los restos adicionales que forman la estructura canónica de Chothia, y 50 - 60, correspondientes a la CDR2 de Kabat

menos los restos 61 - 65, que raramente participan directamente en la unión al antígeno. Las dos primeras entradas tienen 8 identidades en estos segmentos cuando se comparan con la secuencia de ratón, y las cinco siguientes tienen 7 identidades. El 25 % principal de entradas en la clasificación de similitud son, de este modo, los dos genes con 8 identidades y cualquiera de éstas con siete. Aunque cualquiera de estos siete genes serían candidatos adecuados para una construcción de humanización, muchos son preferentes debido a la conservación en restos no idénticos. Tres que tienen Glu o Arg reemplazando a Met en el resto 50 están excluidas debido a que el soterramiento de una cadena lateral cargada en el medio de un segmento hidrófobo es probable que proporcione una estructura tridimensional alterada. De este modo, el V71-4 se eligió a partir de las cuatro restantes.

10 El JH4 es claramente el que mejor coincide con el extremo C terminal de CDR3.

Se diseñó el anticuerpo humanizado quimérico combinando las CDR de Kabat de D1.3 con las estructuras de Kabat codificadas por V71-4, JH4, L23 y Jk4. Las secuencias de los dominios variables de cadena pesada y ligera de este anticuerpo se muestran en la figura 5.

15 Los genes de dominio variable sintético que codifican los Vk y VH se prepararon a partir de oligonucleótidos oligoméricos mediante el procedimiento de Ye y col. (1992), incorporado al presente documento como referencia. Estos genes se transfirieron a continuación al vector de expresión pAK19 de Fab, descrito por Carter y col. (1992), incorporado al presente documento como referencia. Las secuencias de ADN de los genes sintéticos y del casete de expresión de pAK19 de Fab se muestran en la figura 6. el Fab recombinante se expresó en E. coli, se liberó desde el periplasma por choque osmótico y se purifican mediante cromatografía en lisozima sefarosa.

20 La afinidad de SHuD1.3 por el lisozima se determinó mediante el procedimiento de inactivación por fluorescencia descrito por Foote y Winter (1992). El procedimiento se basa en cambios en la fluorescencia de triptofano intrínseca del anticuerpo y antígeno después de la formación de complejo. En el experimento de la figura 7, se valoró Fab de D1.3 humanizado 200 nM con pequeñas partes alícuotas de una solución de lisozima concentrada. Los datos de fluorescencia se ajustaron en al menos los cuadrados con la ecuación de valoración para obtener un valor y el error típico para la constante de disociación, 23 ± 5 nM. Por comparación, el Kd de D1.3 IgG se sabe que tiene una Kd de 4 nM (Foote y Winter, 1992). De este modo, el anticuerpo humanizado del Ejemplo 1 tiene una especificidad antigénica idéntica al anticuerpo de ratón sujeto y se une al antígeno con una afinidad disminuida en menos que un factor de 6 con relación al anticuerpo sujeto.

Ejemplo 2

35 CD28 Antihumano humanizado

El anticuerpo CD28 antihumano de ratón designado 9.3 se usó como anticuerpo sujeto no humano. La línea de hibridoma de 9.3 de ratón se aisló y se describe por Hansen y col. (1980).

40 Los genes de las regiones de cadena pesada y ligera de 9.3 se clonaron mediante transcripción inversa y la reacción en cadena de la polimerasa, comenzando con el ARN mensajero que ha sido aislado por un procedimiento de isotiocianato de guanidinio (Chomczynski y Sacchi, 1987) seguido de cromatografía en columnas oligo dT. La amplificación se realizó usando oligonucleótidos complementarios con la región constante y los oligonucleótidos correspondientes a las regiones del péptido señal o secuencia estructural N-terminal.

45 La cadena ligera se enumeró según Kabat, y a las CDR se les asignaron tipos de estructura canónica tal como sigue, con referencia a la figura 8.

50 La CDR1 de cadena ligera, numerada según Kabat, consiste en la secuencia

24 25 26 27 a b c d 28 29 30 31 32 33 34
R A S E S V E Y Y V T S L M Q

Debido a los restos insertados entre 27 y 31, la CDR1 tiene una estructura canónica de tipo S.

55 La CDR2 de cadena ligera, numerada según Kabat, consiste en la secuencia

50 51 52 53 54 55 56
A A S N V E S

60 Ésta no es una secuencia excepcional, su estructura canónica es de tipo 1.

La CDR3 de cadena ligera, numerada según Kabat, consiste en la secuencia

89 90 91 92 93 94 95 96

Q Q S R K V P Y

5 Debido a la longitud y a la Pro en la posición 95, esta secuencia es consecuente con la estructura canónica de tipo 1.

Las secuencias Vk con estructura canónica de tipo 5 en la CDR1 no están representadas en la línea germinal humana, pero las estructuras 3 y 4 semejan estructuras canónicas de tipo 5, y se consideran posteriormente.

10 En la compilación de la figura 2 ocho genes Vk de línea germinal humana no redundante codifican (1) la CDR1 con el tipo 3 ó 4 de estructura canónica, (3) la CDR2 con el tipo 1 de estructura canónica y (3) una secuencia con el potencial para formar el tipo 1 de estructura canónica en la CDR3. Están enumeradas en la figura 8 en la secuencia Vk de 9.3. También se proporciona su secuencia en la CDR de Kabat. Los genes Vk humanos en la figura 3 están clasificados según el número de identidades resto a resto en las posiciones de restos que forman la estructura canónica de Chothia. El gen B3 tiene 7 identidades en esta posición, mientras que los tres siguientes en la lista tienen 5, por lo que se eligió B3 para la construcción de humanización. Habiendo basado el registro en las posiciones de CDR de Kabat más que en las de Chothia, el B3 sería todavía un candidato principal. El resto de Tyr que codifica en 5' del Jk2 humano coincide con la posición correspondiente de 9.3 exactamente, por lo que se usó este fragmento de línea germinal.

20 El dominio variable de cadena pesada de 9.3 se numeró según Kabat, tal como muestra la figura 9. A las CDR se les asignaron tipos de estructura canónica tal como sigue.

25 La secuencia en la región de cadena pesada CDR1 es

27 28 29 30 31 32 33 34 35

F S L S D Y G V H

Esta secuencia carece de residuos insertados, por lo que se le asigna una estructura canónica de tipo 1.

30 La CDR2 de Kabat de 9.3 tiene la secuencia

50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65

V I W A G G G T N Y N S A L M S

35 Debido a que no hay inserciones entre los restos 52 y 56, a la CDR2 se le asigna una estructura canónica de tipo 1. Los genes VH de línea germinal humana que se ha predicho que tienen una estructura canónica de tipo 1 en la CDR1 y una estructura canónica de tipo 1 en la CDR2 están tomadas de Chothia y col. (1992) y la figura 1, y se enumeran en la figura 9.

40 Los segmentos elegidos para la evaluación de homología fueron 27 - 35, correspondientes a la CDR1 de Kabat más los restos adicionales que forman la estructura canónica de Chothia, y 50 - 60, correspondientes a la CDR2 de Kabat menos los restos 61 - 65, que raramente participan directamente en la unión al antígeno. Las secuencias se registraron por números de restos idénticos cuando se compararon con 9.3, y se ordenaron por registro en la figura 9. El gen DP-45 tiene el número más alto de identidades, 10, en una comparación resto a resto con 9.3; las siguientes 6 entradas tienen todas 9. El DP-45 se eligió para la construcción de humanización.

45 De los segmentos JH humanos, el JH4 tiene la homología más cercana al extremo C terminal de CDR3 en 9.3, por lo que se usó en la construcción.

50 Los dominios variables del anticuerpo humanizado quimérico se diseñaron combinando secuencias tal como sigue. El dominio variable de cadena ligera está constituido por secuencias de CDR de Kabat de la cadena ligera de 9.3, con la excepción del resto 34, que se pensó que no era crítico con el reconocimiento del antígeno, por lo que se fabricó Ala, idéntico al resto en B3 esa posición; y las secuencias estructurales idénticas a B3 hasta el resto 88 e idénticas a Jk2 de la posición 98 a la 108, con la excepción de los restos 70 y 72, que se mantuvieron idénticos a 9.3 para conservar el motivo de glucosilación de estas formas de restos en combinación con el resto 71. El dominio variable de cadena pesada está constituido por secuencias de CDR de Kabat CDR de la cadena pesada de 9.3, con la excepción de los restos 60 - 65, que se pensó que eran críticos con el reconocimiento del antígeno y, por ello, se hicieron idénticos a la secuencia de DP-45 en esas posiciones; y las secuencias estructurales de Kabat idénticas a DP-45 en el resto 94 e idénticas a JH4 del resto 103 al 113.

Las secuencias de los dominios variables de cadena pesada y ligera de este anticuerpo se muestran en la figura 10. Una recombinación del fragmento Fab con dominios variables de estas secuencias se preparó tal como se describe en el Ejemplo 1, con la excepción de usar cromatografía de afinidad sobre la proteína G sefarosa para la purificación. Como control se preparó un fragmento Fab que estaba comprendido por dominios variables de 9.3 de ratón y dominios constantes humanos mediante procedimientos similares, tal como un fragmento Fab híbrido estaba comprendido por dominios constantes humanos, dominio variable de cadena pesada de 9.3 de ratón y dominio variable de cadena ligera humanizada.

La capacidad de los tres Fab para unirse a CD28 se examinó mediante ELISA. Las placas recubiertas con CD28lg se incubaron con soluciones de Fab a concentraciones que variaban de 1 pM a 10 mM. La unión se analizó a continuación con un inmunocnjugado k antihumano. Las isotermas de unión generadas se procesaron para determinar la concentración equivalente por la unión semimáxima de los anticuerpos a CD28lg (CE50) tal como se describe en Jin y col. (1992), incorporada al presente documento como referencia. Este análisis, que se muestra en la figura 11, indica que el Fab de ratón tenía una CE50 de 20 nM, la CE50 de Hu9.3 fue 630 nM y la CE50 del Fab híbrido fue 30 nM. La similitud de las avidedces de los Fab híbrido y de ratón mostró que la reducción en la unión por 9.3 humanizado podía atribuirse a las interacciones débiles que implican a la cadena ligera, causando de este modo la humanización de la cadena ligera sola una pérdida de avided mínima.

Ejemplo 3

Toxina antiescorpión humanizada

El anticuerpo de toxina antiescorpión de ratón denominado BCF2 se usó como secuencia no humana sujeto para una toxina antiescorpión humanizada. Se describió la línea de hibridoma BCF2 de ratón, y la eficacia del anticuerpo de BCF2 en un modelo de ratón demostrado por Licea y col. (1996). La secuencia de los dominios variables de BCF2 se dio a conocer por Selisko y col. (1999), y se presenta en la figura 12.

Los tipos de estructura canonical de la cadena ligera se determinaron tal como se ha descrito anteriormente y fueron el tipo 5 para CDR1, el tipo 1 para la CDR2 y el tipo 1 para la CDR3. Los tipos de estructura canonical de las CDR de cadena pesada son tipo 1 para la CDR1 y tipo 2 para la CDR2. Se diseñó una versión humanizada de BCF2 usando las consideraciones abordadas anteriormente para la selección de secuencias génicas V y J de línea germinal humana.

El dominio variable de cadena ligera estaba constituido por secuencias de CDR de Kabat de la cadena ligera de BCF2; y las secuencias estructurales eran idénticas al gen humano A2/DPK12 hasta el resto 88 e idénticas a Jk4 de la posición 98 a la 108. El dominio de cadena pesada estaba constituido por secuencias de CDR de Kabat de la cadena pesada de BCF2, con la excepción de los restos 62 - 65, que se pensó que no eran críticos con el reconocimiento de la secuencia de 1-f/DP3 en esas posiciones; y las secuencias estructurales de Kabat eran idénticas a 1-f/DP3 hasta el resto 94 e idénticas a JH6 del resto 103 al 113.

Las secuencias de los dominios variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo BCF2 humanizado se muestran en la figura 12. Un fragmento Fab recombinante con dominios variables que tenían estas secuencias se preparó tal como se ha descrito en el Ejemplo 2. Como control se preparó un fragmento de (Fab)₂ de digestión de pepsina de IgG de BCF2 de ratón obtenido a partir de células de hibridoma.

La capacidad de los dos Fabs para unirse a CD28 se examinó usando un instrumento biosensor BIAcore, con toxina inmovilizada sobre la superficie del chip sensor y anticuerpo en el sobrenadante. Este procedimiento se ha descrito por Jönsson y col. (1991), y se ha incorporado al presente documento como referencia. Las soluciones de Fab a concentraciones que variaban en al menos un intervalo de 10 veces se pasaron sobre el chip para observar la fase de asociación. El sensograma se continuó con tampón solo en la fase fluida para observar la disociación. La afinidad, como constante de equilibrio de disociación K_d se determinó a partir de la relación de las constantes de velocidad cinética kon/koff. Las afinidades respectivas fueron 10 nM para el (Fab)₂ de ratón y +140 nM para la versión humanizada.

Ejemplo 4

GAD65 Antihumano humanizado

El anticuerpo de ratón para la isoforma de ácido glutámico descarboxilasa humana de 65 kilodalton, NGAD65.

La línea de hibridoma de NGAD65 de ratón y las secuencias de sus dominios variables de anticuerpo se describieron por Hampe y col. (2001) y las secuencias se presentan en la figura 13. Los dos primeros restos de la cadena ligera se omiten debido a que se derivaron del oligonucleótido usado para la clonación.

Se determinó que los tipos de estructura canónica de las CDR de cadena ligera eran el tipo 4 para la CDR1, el tipo 1

para la CDR2 y el tipo 1 para la CDR3. Se determinó que los tipos de estructura canónica de las CDR de cadena pesada eran el tipo 1 para la CDR1 y el tipo 2 para la CDR2.

5 Se diseñó una versión humanizada de NGAD65 usando las consideraciones abordadas anteriormente para la selección de secuencias génicas V y J de línea germinal humana. El dominio variable de cadena ligera estaba constituido por secuencias de CDR de Kabat de la cadena ligera de NGAD65; y las secuencias estructurales eran idénticas al gen Vk humano de A17/DPK18 hasta el resto 88 e idénticas a Jk3 de la posición 98 a la 108. El dominio de cadena pesada estaba constituido por secuencias de CDR de Kabat de la cadena pesada de BCF2, con la excepción de los restos 61 - 65, que se pensó que no eran críticos con el reconocimiento de la secuencia de 1-v en esas posiciones; y las secuencias estructurales de Kabat eran idénticas a 1-f/DP3 hasta el resto 94 e idénticas a JH4 del resto 103 al 113.

15 Las secuencias de los dominios variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo NGAD65 humanizado se muestran en la figura 13. Un fragmento Fab recombinante con dominios variables que tenían estas secuencias se preparó tal como se ha descrito en el Ejemplo 2. Como control se preparó un fragmento Fab que comprendía dominios variables y constantes de NGAD65 mediante procedimientos similares.

20 La capacidad de los tres Fab para unirse al antígeno se examinó mediante un ensayo de inmunoprecipitación. La ácido glutámico descarboxilasa humana radioactiva se preparó mediante translación in vitro con metionina 35S. El antígeno etiquetado se incubó durante la noche con diversas concentraciones de cada uno de los dos fragmentos Fab. Se añadieron a continuación perlas de proteína G sefarosa al Fab secuestrado y cualquier antígeno asociado. La radioactividad se determinó por recuento de escintilación y se determinó la CE50 visualmente a partir del punto medio de gráficos de radioactividad unida frente a concentración del fragmento de Fab. Se obtuvieron valores de CE50 de 0,36 pM para el Fab de ratón y de 9 pM para el Fab humanizado. Incluso dada una pérdida de afinidad de 25 veces del anticuerpo humanizado con relación al anticuerpo de ratón, el humanizado todavía se unirá al antígeno de modo suficiente para usarse en seres humanos en terapia sin necesidad de mutagénesis posterior de la secuencia para maquillar la pérdida de afinidad de 25 veces.

30 Los procedimientos que se proporcionan en el presente documento se han ejemplificado para el uso de genes de anticuerpo maduros de ratón como fuente de la primera CDR canónica de Chothia y genes de anticuerpo humano como fuente para la segunda CDR canónica de Chothia. Estos ejemplos son particularmente adecuados para la construcción de anticuerpos humanizados para su uso en aplicaciones terapéuticas en seres humanos. Dichos anticuerpos humanizados contiene suficientes secuencias amino de ratón para retener una estructura de tres dimensiones necesaria para la unión al antígeno ávida pero también contienen suficientes secuencias de anticuerpo humano para evitar una inmunogenicidad no deseada en seres humanos. Un experto en la técnica apreciará, no obstante, que los procedimientos dados a conocer en el presente documento son aplicables igualmente a la preparación de anticuerpos convertidos que incluyen regiones hipervariables quiméricas derivadas de cualquiera de las dos especies diferentes de vertebrados.

40 En un sentido más general, la primera secuencia de anticuerpo, que se selecciona originalmente en virtud de su unión a un antígeno, puede referirse a una secuencia de anticuerpo "sujeto". Típicamente, la secuencia de anticuerpo sujeto es originaria de ratón o de rata. La segunda secuencia de anticuerpo, que se selecciona a partir de secuencias de anticuerpo del animal diana, puede denominarse secuencia de anticuerpo "objeto". La secuencia de anticuerpo objeto es, típicamente, de un ser humano o de un animal de granja que sea el objeto del tratamiento terapéutico. Las composiciones de anticuerpos que contienen las regiones hipervariables quiméricas según los procedimientos de la presente invención dan como resultado una tercera secuencia de anticuerpo que puede denominarse generalmente una secuencia de anticuerpo "convertida". La secuencia de anticuerpo convertida difiere en determinadas características estructurales definidas de cada una de las secuencias de los anticuerpos sujeto y objeto y es idéntica en otras determinadas características estructurales definidas para cada uno de las secuencias sujeto u objeto.

Referencias

- 55 Carter, P., Kelley, R. F., Rodrigues, M. L., Snedecor, B., Covarrubias, M., Velligan, M. D., Wong, W. L. T., Rowland, A. M., Kotts, C. E., Carver, M. E., Yang, M., Bourell, J. H., Shepard, H. M. & Henner, D. (1992) High level *Escherichia coli* expression and production of a bivalent humanized antibody fragment. *Bio/Technology* 10, 163-167.
- 60 Chothia, C. y Lesk, A. M. (1987) Canonical structure types for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 96, 901-917.
- Chothia, C., Lesk, A. M., Gherardi, E., Tomlinson, I. M., Walter, G., Marks, J. D., Llewelyn, M. B. y Winter, G. (1992) Structural repertoire of the human VH segments. *J. Mol. Biol.* 227, 799-817.
- 65 Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

- 5 Foote, J. & Winter, G. (1992) Antibody residues affecting conformation of the hypervariable loops. *J. Mol. Biol.* 224, 487-499.
- Hampe, C. S., Lundgren, P., Daniels, T. L., Hammerle, L. P., Marcovina, S. M. y Lernmark, A. (2001) A novel monoclonal antibody specific for the N-terminal end of GAD65. *J Neuroimmunol.* 113,63-71.
- 10 Hansen, J. A., Martin, P. J. y Nowinski, R. C. (1980) Monoclonal antibodies identifying a novel T cell antigen and Ia antigens of human lymphocytes. *Immunogenetics* 10, 247-260.
- Jin, L., Fendly, B. M. y Wells, J. A. (1992) High resolution functional analysis of antibody-antigen interactions. *J. Mol. Biol.* 226, 851-865.
- 15 Jones, P. T., Dear, P. H., Foote, J., Neuberger, M. S. y Winter, G. (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321, 522-525.
- Jönsson, U., Fågerstam, L., Ivarsson, B., Lundh, K., Löfås, S., Persson, B., Roos, H., Rönnberg, I., Sjölander, S., Stenber, E., Ståhlberg, R., Urbaniczky, C., Östlin, H. y Malmqvist, M. (1991) Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *BioTechniques* 11, 620-627.
- 20 Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. y Coeller, K. (1991) Sequences of proteins of immunological interest. 5^a ed. 1991, Bethesda: Departamento de salud y servicios humanos de Estados Unidos, PHS, NIH.
- 25 Licea, A. F., Becerril, B. y Possani, L. D. (1996) Fab fragments of the monoclonal antibody BCF2 are capable of neutralizing the whole soluble venom from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffman. *Toxicon* 34, 843-847.
- 30 MacCallum, R. M., Martin, A. C. R. y Thornton, J. M. (1996) Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J. Mol. Biol.* 262, 732-745.
- Padlan. E. (1991) A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand binding properties, *Molecular Immunology* 28:489-498
- 35 Padlan, E. O., Abergel, C. y Tipper, J. P. (1995) Identification of specificity-determining residues in antibodies. *FASEB J.* 9, 133-139.
- 40 Riechmann, L., Clark, M., Waldmann, H. y Winter, G. (1988) Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 332, 323-327.
- (Rutgeerts, P. y col (1999) Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (INFLIXIMAB) to maintain remission in Crohn's disease. *Gastroenterology* 117, 761-769).
- 45 Selisko, B., Licea, A. F., Becerril, B., Zamudio, F., Possani, L. D. y Horjales, E. (1999) Antibody BCF2 against scorpion toxin Cn2 from *Centruroides noxius* Hoffman: primary structure and three-dimensional model as free Fv fragment and complexed with its antigen. *Proteins* 37, 130-143.
- 50 Tamura, M., Milenic, D., Iwahashi, M., E., P., Schlom, J. y Kashmiri, S. (2000) Structural Correlates of an Anticarcinoma Antibody: Identification of Specificity-Determining Residues (SDRs) and Development of a Minimally Immunogenic Antibody Variant by Retention of SDRs Only. *J. Immunol.* 164, 1432-1441.
- Tomlinson, I. M., Cox, J. P. L., Gherardi, E., Lesk, A. M. y Chothia, C. (1995) The structural repertoire of the human Vk domain. *EMBO J.* 14,4628-4638.
- 55 Wu, T. T. y Kabat, E. A. (1970) An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J. Exp. Med.* 132, 211-250.
- 60 Ye, Q.-Z., Johnson, L. L. & Baragi, V. (1992) Gene synthesis and expression in *E. coli* for PUMP, a human matrix metalloproteinase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 186, 143-149. Martin, A. C. R. & Thornton, J. M. (1996) Structural families in loops of homologous proteins: automatic classification, modelling and application to antibodies. *J. Mol. Biol.* 263, 800-815.
- 65 Henikoff, S. y Henikoff, J. G. (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 10915-10919.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Foote, Jefferson

<120> Anticuerpos superhumanizados

<130> 501231.02

5 <140> PCT/US02/22011

<141> 2002-07-12

<150> US 60/305,111

<151> 2001-07-12

<160> 122

10 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 1

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

<210> 2

<211> 98

<212> PRT

ES 2 370 225 T3

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg

5

<210> 3

<211> 96

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 3

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

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

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

Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly
50 55 60

Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu
65 70 75 80

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

<210> 4

ES 2 370 225 T3

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

5

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

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

Ala Arg

<210> 5

<211> 98

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 370 225 T3

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

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

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

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

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

Ala Thr

<210> 6

<211> 98

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ala Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Thr Pro Phe Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg

10 <210> 7

<211> 98

ES 2 370 225 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

5 <210> 8

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

10

ES 2 370 225 T3

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

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

Ala Ala

<210> 9

<211> 98

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

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

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

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

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

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

Ala Arg

<210> 10

<211> 98

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

ES 2 370 225 T3

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

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

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg

<210> 11

5 <211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

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

Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Thr

10 <210> 12

ES 2 370 225 T3

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser
50 55 60

5

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala His Arg
100

<210> 13

<211> 100

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

ES 2 370 225 T3

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

<210> 14

<211> 100

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 14

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

10 <210> 15

<211> 98

ES 2 370 225 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

5 <210> 16

<211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

10

ES 2 370 225 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Asp

<210> 17

<211> 98

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 17

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

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

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 18

<211> 97

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

ES 2 370 225 T3

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg

<210> 19

5 <211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Arg Ile Lys Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Thr Thr
 100

10 <210> 20

ES 2 370 225 T3

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

5

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 21

<211> 98

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

ES 2 370 225 T3

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

Ala Arg

<210> 22

<211> 98

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 22

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

Ala Lys

10 <210> 23

ES 2 370 225 T3

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

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

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

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys

5

<210> 24

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 24

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

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

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

ES 2 370 225 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 25

<211> 98

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 25

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

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

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys

<210> 26

<211> 98

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

ES 2 370 225 T3

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

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

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 27

5 <211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

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

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

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Leu Ile Ser Trp Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Asp

10 <210> 28

ES 2 370 225 T3

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

5

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 29

<211> 97

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

ES 2 370 225 T3

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

Arg

<210> 30

<211> 98

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 30

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

Ala Arg

10 <210> 31

ES 2 370 225 T3

<211> 97

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

Arg

5

<210> 32

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 32.

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

ES 2 370 225 T3

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg
 100

<210> 33

<211> 98

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 33

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

<210> 34

<211> 98

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

ES 2 370 225 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Asn Trp Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Lys 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

<210> 35

5 <211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

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

Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

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

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

Ala Arg

10 <210> 36

ES 2 370 225 T3

<211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

5

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg

<210> 37

<211> 99

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

ES 2 370 225 T3

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

<210> 38

<211> 99

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 38

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

10 <210> 39

ES 2 370 225 T3

<211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

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

5

<210> 40

<211> 97

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 40

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

ES 2 370 225 T3

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

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

Arg

<210> 41

<211> 99

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 41

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg

<210> 42

<211> 97

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

ES 2 370 225 T3

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

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg

<210> 43

5 <211> 99

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

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

Cys Ala Arg

10 <210> 44

<211> 98

ES 2 370 225 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

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 Ser Gly
20 25 30
Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Ile Gly Ser Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

5

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val 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

<210> 45

<211> 98

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 45

ES 2 370 225 T3

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 46

<211> 101

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 46

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg
100

10 <210> 47

ES 2 370 225 T3

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

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

Ala Arg

5

<210> 48

<211> 97

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 48

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

ES 2 370 225 T3

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg

<210> 49

<211> 97

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 49

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

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

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Ile His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg

<210> 50

<211> 97

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

ES 2 370 225 T3

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

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

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Asn Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg

<210> 51

5 <211> 97

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ala Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Thr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

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

Arg

10 <210> 52

ES 2 370 225 T3

<211> 97

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

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

5

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg

<210> 53

<211> 97

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

ES 2 370 225 T3

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

Arg

<210> 54

<211> 95

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 54

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro
 85 90 95

10 <210> 55

<211> 95

<212> PRT

ES 2 370 225 T3

<213> Homo sapiens

<400> 55

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

<210> 56

5

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr 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 Tyr Asp Asn Leu Pro
85 90 95

10

<210> 57

<211> 95

<212> PRT

ES 2 370 225 T3

<213> Homo sapiens

<400> 57

```

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 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20          25          30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35          40          45
Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr 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 Tyr Asp Asn Leu Pro
85          90          95

```

<210> 58

5

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

```

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

```

10

<210> 59

<211> 95

<212> PRT

ES 2 370 225 T3

<213> Homo sapiens

<400> 59

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

<210> 60

5

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

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

10

<210> 61

<211> 95

<212> PRT

ES 2 370 225 T3

<213> Homo sapiens

<400> 61

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 Gly Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

5

<210> 62

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 62

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 Arg Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

<210> 63

<211> 95

ES 2 370 225 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

5

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

<210> 64

<211> 95

<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<400> 64

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro
85 90 95

ES 2 370 225 T3

<210> 65

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 65

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
          20           25           30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35           40           45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro
          85           90           95
    
```

<210> 66

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 66

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
          20           25           30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35           40           45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro
          85           90           95
    
```

ES 2 370 225 T3

<210> 67

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 67

```

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

<210> 68

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 68

```

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

ES 2 370 225 T3

<210> 69

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 69

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

<210> 70

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 70

Val Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu Leu Ser Ala Ser Thr Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Met Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

ES 2 370 225 T3

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Cys Leu Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Pro
85 90 95

<210> 71

<211> 95

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 71

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

<210> 72

<211> 95

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

ES 2 370 225 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser
85 90 95

<210> 73

5 <211> 101

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

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

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95

Arg Ile Glu Phe Pro
100

10 <210> 74

<211> 101

<212> PRT

ES 2 370 225 T3

<213> Homo sapiens

<400> 74

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

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95

Arg Ile Glu Phe Pro
100

5

<210> 75

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 75

ES 2 370 225 T3

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

<210> 76

<211> 100

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 76

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

10 <210> 77

ES 2 370 225 T3

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Phe Leu Ser Leu Ser Val Thr Arg Gln
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Val Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gln Gln Ser
35 40 45

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

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
85 90 95

Thr His Leu Pro
100

5

<210> 78

<211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 78

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

ES 2 370 225 T3

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
85 90 95

Ile Gln Leu Pro
100

<210> 79

<211> 100

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 79

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95

Leu Gln Thr Pro
100

<210> 80

<211> 100

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

ES 2 370 225 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Leu Gln Thr Pro
 100

<210> 81

5 <211> 100

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95

Thr Gln Phe Pro
 100

10 <210> 82

ES 2 370 225 T3

<211> 96

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

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

5

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

<210> 83

<211> 96

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

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

ES 2 370 225 T3

<210> 84

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 84

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro
85 90 95

<210> 85

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 85

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro
85 90 95

ES 2 370 225 T3

<210> 86

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 86

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
85 90 95

<210> 87

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 87

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Tyr

ES 2 370 225 T3

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

<210> 88

<211> 96

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 88

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

<210> 89

<211> 101

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

ES 2 370 225 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50

55

60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro
 100

<210> 90

5 <211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Asp Lys Val Asn Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asp Asp Asp
 20 25 30

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
 35 40 45

Gln Glu Ala Thr Thr Leu Val Pro Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro
 85 90 95

10 <210> 91

ES 2 370 225 T3

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala

5

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro
85 90 95

<210> 92

<211> 95

10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

ES 2 370 225 T3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro
 85 90 95

<210> 93

<211> 95

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 93

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Gly Ile Gly Asn Tyr
 20 25 30

Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile 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 Lys His Pro
 85 90 95

<210> 94

<211> 108

10 <212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 94

ES 2 370 225 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Thr Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 95

<211> 13

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 96

<211> 13

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 97

15 <211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 370 225 T3

<400> 97

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 98

<211> 13

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 99

10 <211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

15 <210> 100

<211> 116

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 100

ES 2 370 225 T3

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

<210> 101

<211> 96

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 101

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Asp
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr

20

25

30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40 45
 Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 50 55 60
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 65 70 75 80
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 85 90 95

10 <210> 102

ES 2 370 225 T3

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

....

Ala Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
1 5 10 15

Ser

5

<210> 103

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 103

Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
1 5 10 15

Ser

<210> 104

<211> 15

<212> PRT

15

<213> Homo sapiens

<400> 104

Ala Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 105

<211> 15

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

ES 2 370 225 T3

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 106

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 106

Asn Trp Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

<210> 107

<211> 20

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 107

Tyr Tyr Tyr Asp Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
1 5 10 15

Thr Val Ser Ser
20

<210> 108

15 <211> 1730

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> humanized chimeric D1.3 antibody

20 <220>

<221> CDS

<222> (119)..(832)

<223>

<220>

ES 2 370 225 T3

<221> CDS

<222> (914)..(1666)

<223>

<400> 108

gctgtcataa agttgtcacg gccgagactt atagtcgctt tgtttttatt ttttaatgta
60

tttgtaacta gaattcgagc tcggtaccgc gggatcctct agaggttgag gtgatttt
118

atg aaa aag aat atc gca ttt ctt ctt gca tct atg ttc gtt ttt tct
166

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
1 5 10 15

att gct aca aac gcg tat gct gct atc cgt atg acc cag tcc ccg ttc
214

Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Phe
20 25 30

tct ctg tcc gct tct gtt ggt gac cgt gtt acc atc acc tgc cgt gct
262

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
35 40 45

tct ggt aac atc cac aac tac ctg gct tgg tac cag cag aaa ccg gct
310

Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala

ES 2 370 225 T3

50	55	60
aaa gct ccg aaa ctg ttc atc tac tac act act acc ctg gct gac ggt 358 Lys Ala Pro Lys Leu Phe Ile Tyr Tyr Thr Thr Thr Leu Ala Asp Gly 65 70 75 80		
ggt ccg tct cgt ttc tcc ggt tct ggt tcc ggt act gac tac act ctg 406 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu 85 90 95		
act atc tct tct ctg cag ccg gaa gac ttc gct act tac tac tgc cag 454 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln 100 105 110		
cac ttc tgg tcc act ccg cgt act ttc ggt ggt ggt act aaa gtt gaa 502 His Phe Trp Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu 115 120 125		
atc aaa cgt acg gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct 550 Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser 130 135 140		
gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat 598 Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn 145 150 155 160		
aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc 646 Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala 165 170 175		
ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag 694 Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys 180 185 190		
gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac 742 Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp 195 200 205		
tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg 790 Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu 210 215 220		
agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt taa 832 Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 225 230 235		
gctgatcctc tacgccggac gcacgtggc ccttgtagac aagttcacgt aaaaagggta 892		
tctagagggt gaggtgattt t atg aaa aag aat atc gca ttt ctt ctt gca 943 Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala 240 245		
tct atg ttc gtt ttt tct att gct aca aac gcg tac gct cag gtt cag 991 Ser Met Phe Val Phe Ser Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Gln Val Gln 250 255 260		

ES 2 370 225 T3

ctg cag gaa tct ggt ccg ggt ctg gtt aaa ccg tct gaa act ctg tct
 1039
 Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser
 265 270 275

ctg act tgc act gtt tct ggt ggt tct gtt tct ggt tac ggt gtt aac
 1087
 Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Gly Tyr Gly Val Asn
 280 285 290 295

tgg atc cgt cag ccg ccg ggt aaa ggt ctg gaa tgg atc ggt atg atc
 1135
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile
 300 305 310

tgg ggt gac ggt aac act gac tac aac tct tct ctg aaa tct cgt gtt
 1183
 Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val
 315 320 325

act atc tct gtc gac act tct aaa aac cag ttc tct ctg aaa ctg tct
 1231
 Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser
 330 335 340

tct gtt act gct gct gac act gct gtt tac tac tgc gct cgt gaa cgt
 1279
 Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Arg
 345 350 355

gac tac cgt ctg gac tac tgg ggt cag ggt act ctg gtt act gtt tct
 1327
 Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 360 365 370 375

tct gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc
 1375
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 380 385 390

aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac
 1423
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 395 400 405

tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc
 1471
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 410 415 420

agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga etc tac
 1519
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 425 430 435

tcc etc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag
 1567
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 440 445 450 455

acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtc gac
 1615
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 460 465 470

aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc gcc gcg
 1663
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala
 475 480 485

tga cgcgccatgc gacggcccta gagtcacctaa cgctcgggtg ccgcccggcg
 1716

ttttttattg ttaa
 1730

ES 2 370 225 T3

<210> 109

<211> 237

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> anticuerpo D1.3 quimérico humanizado

<400> 109

```

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
 1           5           10           15

Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Phe
           20           25           30

Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
 35           40           45

Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala
 50           55

Lys Ala Pro Lys Leu Phe Ile Tyr Tyr Thr Thr Thr Leu Ala Asp Gly
 65           70           75           80

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu
           85           90           95

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
           100          105          110

His Phe Trp Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
           115          120          125

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser
 130          135          140

Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
 145          150          155          160

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
           165          170          175

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys
           180          185          190

Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp
           195          200          205

Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu

```

ES 2 370 225 T3

210

215

220

Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 110

<211> 250

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo D1.3 quimérico humanizado

<400> 110

ES 2 370 225 T3

Met Lys Lys Asn Ile Ala Phe Leu Leu Ala Ser Met Phe Val Phe Ser
 1 5 10 15

Ile Ala Thr Asn Ala Tyr Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro
 20 25 30

Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
 35 40 45

Gly Gly Ser Val Ser Gly Tyr Gly Val Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro
 50 55 60

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Asn Thr
 65 70 75 80

Asp Tyr Asn Ser Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr
 85 90 95

Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp
 100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Asp Tyr Arg Leu Asp Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val

ES 2 370 225 T3

210 215 220

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Ala Ala
 245 250

<210> 111
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 111

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
 20 25 30

Val Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45

Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Phe Ser Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Asp Glu Asp Asp Val Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg
 85 90 95

Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 112

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Mus sp.

<400> 112

ES 2 370 225 T3

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
 20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
 50 55 60

Ser Arg Lys Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 113

5 <211> 112

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> fragmento Fab de C28 antihumano humanizado

10 <400> 113

ES 2 370 225 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
20 25 30

Val Thr Ser Leu Met Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Phe Ser Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

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

Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 114

<211> 120

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> fragmento Fab de CD28 (Hu.9.9) antihumano humanizado

<400> 114

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

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

10

ES 2 370 225 T3

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

<210> 115

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Mus sp.

<400> 115

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

<210> 116

<211> 112

10 <212> PRT

<213> secuencia artificial

ES 2 370 225 T3

<220>

<223> fragmento Fab de toxina antiescorpión humanizada

<400> 116

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

5

<210> 117

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 117

ES 2 370 225 T3

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

<210> 118

<211> 117

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> fragmento Fab de toxina antiescorpión humanizada

<400> 118

ES 2 370 225 T3

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

<210> 119

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Mus sp.

<400> 119

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

ES 2 370 225 T3

Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 120

<211> 122

<212> PRT

5 <213> secuencia artificial

<220>

<223> fragmento Fab de ácido glutámico descarboxilasaAD65) antihumana humanizada

<400> 120

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

10 <210> 121

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 121

ES 2 370 225 T3

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Val Arg Ser Tyr Asp Tyr Asp Ala Pro Phe Ala Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 122

5

<211> 119

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> fragmento Fab de ácido glutámico descarboxilasaAD65) antihumana humanizada

<400> 122

ES 2 370 225 T3

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

69

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un procedimiento para fabricar una molécula de anticuerpo quimérico, que comprende:
- 10 determinar un tipo canónico de estructura de CDR para al menos dos CDR en una región variable sujeto de un anticuerpo sujeto;
- 15 seleccionar una región variable objeto de un anticuerpo objeto sobre la base de si la región variable objeto tiene los mismos tipos canónicos de estructura CDR en ubicaciones correspondientes en la región variable objeto; y
- construir una molécula de anticuerpo quimérico que comprende una región variable quimérica que tiene las al menos dos CDR de una región variable sujeto injertadas en la secuencia estructural de la región variable objeto seleccionada en las ubicaciones correspondientes, en la que la secuencia estructural de la región variable quimérica difiere de la secuencia estructural de la región variable objeto seleccionada en no más de 10 restos de aminoácidos.
- 2.** El procedimiento de la reivindicación 1 que comprende injertar cada una de las tres CDR de una región variable sujeto en las ubicaciones correspondientes en la secuencia estructural objeto.
- 20 **3.** El procedimiento de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que la secuencia estructural de la región variable quimérica difiere de la secuencia estructural de la región variable objeto en no más de 5 restos de aminoácidos.
- 4.** El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la secuencia estructural de la región variable quimérica difiere de la secuencia estructural de la región variable objeto en no más de 2 restos de aminoácidos.
- 25 **5.** El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que se selecciona la región variable objeto que incluye un conjunto de regiones variables objeto candidatas que tienen los mismos tipos de estructura de CDR canónicos que las CDR sujeto y clasificar el conjunto de regiones variables objeto comparando la similitud posición a posición de restos de aminoácidos de las CDR sujeto con las CDR objeto correspondientes de acuerdo con un criterio de ordenación.
- 30 **6.** El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la región variable objeto se selecciona de entre el 25 % superior de las regiones variables candidatas clasificadas.
- 35 **7.** El procedimiento de la reivindicación 5 ó la reivindicación 6, en el que el criterio de clasificación incluye un registro de identidad de aminoácidos entre las secuencias de CDR sujeto y objeto en las posiciones de restos correspondientes de al menos una CDR.
- 40 **8.** El procedimiento de la reivindicación 5 ó la reivindicación 6, en el que el criterio de clasificación incluye un registro de identidad de aminoácidos entre las secuencias de CDR sujeto y objeto en las posiciones de restos correspondientes de al menos dos CDR.
- 9.** El procedimiento de la reivindicación 5 ó la reivindicación 6, en el que el criterio de clasificación incluye un registro de identidad de aminoácidos entre las secuencias de CDR sujeto y objeto en las posiciones de restos correspondientes de al menos tres CDR.
- 45 **10.** El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que el criterio de clasificación incluye un registro de homología de aminoácidos entre las secuencias de CDR sujeto y objeto en las posiciones de restos correspondientes de al menos una CDR.
- 50 **11.** El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que el criterio de clasificación incluye un registro de homología de aminoácidos entre las secuencias de CDR sujeto y objeto en las posiciones de restos correspondientes de al menos dos CDR.
- 55 **12.** El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que el criterio de clasificación incluye un registro de homología de aminoácidos entre las secuencias de CDR sujeto y objeto en las posiciones de restos correspondientes de al menos tres CDR.
- 60 **13.** El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que las CDR son CDR definidas por Kabat.
- 14.** El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que las CDR son bucles de CDR definidas por Chothia.
- 65 **15.** El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14, en el que cada una de las tres CDR sujeto

- es una CDR de cadena ligera, y si una de las tres secuencias de CDR sujeto es de un tipo de estructura canónico ausente de la región variable de cadena ligera objeto, entonces la actuación de seleccionar incluye también seleccionar una región variable objeto con una CDR de un tipo de estructura canónico diferente que el tipo de CDR sujeto que está ausente, con la condición de que el tipo de estructura canónico objeto diferente tenga una longitud de no más de 2 restos de aminoácidos menor o mayor que el tipo de estructura canónica sujeto que está ausente.
- 5
16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que si el tipo de estructura canónico de CDR ausente es del tipo canónico 1, entonces la actuación incluye seleccionar una región variable objeto con una CDR de tipo canónico 2 en la ubicación correspondiente, o si las secuencias de CDR sujeto son del tipo canónico 5 entonces la actuación incluye seleccionar una región variable objeto con un tipo canónico 4 ó 3 en la ubicación correspondiente.
- 10
17. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, que además comprende la sustitución de al menos un resto de aminoácido de una secuencia de CDR sujeto por un aminoácido diferente, con la condición de que no se sustituyen más de 4 restos en cualquiera de la CDR1 de cadena ligera, CDR2 de cadena ligera, CDR3 de cadena ligera, CDR1 de cadena pesada o CDR3 de cadena pesada sujeto y no se sustituyan más de 10 aminoácidos en la CDR2 de cadena pesada sujeto.
- 15
18. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, que además comprende la sustitución de al menos un resto de aminoácido, pero no más de 10, de la secuencia estructural seleccionada por un resto de aminoácido diferente.
- 20
19. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, que comprende fabricar regiones variables quiméricas para cada una de la cadena ligera y la cadena pesada.
- 25
20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que las cadenas ligeras variables quiméricas y las cadenas pesadas quiméricas se diseñan para formar una molécula seleccionada del grupo constituido por un fragmento Fab, una molécula (Fab)₂ y una molécula Fv de cadena única.
- 30
21. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que las cadenas ligeras variables quiméricas y las cadenas pesadas variables quiméricas se diseñan además para que incluyan un dominio de región constante de anticuerpo para el anticuerpo objeto forme un anticuerpo completo.
- 35
22. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la región variable sujeto es una región variable de ratón.
- 40
23. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, en el que la región variable objeto es una región variable humana.
- 45
24. El procedimiento de la reivindicación 23, en el que la secuencia de región variable objeto se selecciona del grupo constituido por secuencias de V_k, V_λ, V_H, J_H, J_k y J_λ humanos.
- 50
25. El procedimiento de la reivindicación 24, que comprende fabricar regiones variables quiméricas para cada una de la cadena ligera y la cadena pesada, en el que las regiones variables quiméricas incluyen las estructuras de secuencias de V_k y V_H humanos.
- 55
26. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, en el que la región variable objeto seleccionada se codifica por un gen de región variable de línea germinal humana.
- 60
27. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, en el que la región variable objeto seleccionada es de un anticuerpo humano maduro.
28. El procedimiento de cualquier reivindicación precedente, que además comprende preparar un ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo quimérica.
29. El procedimiento de la reivindicación 28, que además comprende expresar recombinantemente el ácido nucleico en un tipo de célula adecuado.
30. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, que además incluye la actuación de construir un conjunto de moléculas con regiones variables objeto diferentes, determinar una constante de disociación entre el antígeno y diferentes miembros del conjunto de moléculas y seleccionar una molécula que tenga una constante de disociación de al menos 10⁶M⁻¹, al menos 10⁷M⁻¹ o al menos 10⁸M⁻¹.

Nombre	Posición	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	YHSCC
1-02/DP75		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
1-03/DP25		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
1-08/DP15		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
1-18/DP14		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
1-24/DP5		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
1-45/DP4		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
1-46/DP7		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
1-58/DP2		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
1-6/DP88		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
1-8/DP3		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
2-05/DP76		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
2-26/DP26		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
2-78/DP28		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
3-07/DP54		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
3-09/DP31		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
3-11/DP35		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
3-13/DP48		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
3-15/DP38		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
3-20/DP32		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
3-21/DP77		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
3-23/DP47		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
3-30/DP49		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
3-30.3/DP46		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
3-30.5/DP49		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
3-33/DP50		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
3-43/DP33		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
3-48/DP51		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
3-53/DP42		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
3-54/DP61		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
3-66/DP86		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
3-72/DP29		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
3-74/DP53		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
4-04/DP70		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
4-28/DP68		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
4-31/DP65		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
4-30.2/DP64		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
4-30.4/DP78		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
4-30.1/DP65		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
4-34/DP63		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
4-39/DP79		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
4-59/DP71		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
4-61/DP66		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
4-5/DP67		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
5-51/DP73		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
6-01/DP74		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
7-4.1/DP21		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
/DP45		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
/TCU-VH4. 21		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
/V58		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
/V19. 4		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
/V1. 4		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	
/VH4. 16		1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	96	

Figura 1

Posición Nombre	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	VxCSC
012/DPK9	1	2-1-1
02/DPK9	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	2-1-1
018/DPK1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	2-1-1
08/DPK1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	2-1-1
A20/DPK4	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	2-1-1
A30	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	2-1-1
L14/DPK2	N	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	2-1-1
L1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	2-1-1
L15/DPK7	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	2-1-1
L4	A	I	O	L	T	O	S	P	S	S	2-1-1
L18	A	I	O	L	T	O	S	P	S	S	2-1-1
L5/DPK5	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	2-1-1
L19/DPK6	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	2-1-1
L8/DPK3	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	2-1-1
L23	A	I	R	M	T	Q	S	P	S	S	2-1-1
L9	A	I	R	M	T	Q	S	P	S	S	2-1-1
L24/DPK10	V	I	M	T	Q	S	P	S	S	S	2-1-1
L11/DPK3	A	I	O	M	T	Q	S	P	S	S	2-1-1
L12	D	I	O	M	T	Q	S	P	S	S	2-1-x
011/DPK13	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	3-1-1
01/DPK13	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	3-1-1
A17/DPK18	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	4-1-1
A1/DPK19	D	V	M	T	Q	S	P	S	S	S	4-1-1
A18/DPK28	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	4-1-1
A2/DPK12	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	4-1-1
A19/DPK15	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	4-1-1
A3/DPK15	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	4-1-1
A23/DPK16	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	4-1-1
A27/DPK22	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	6-1-1
A11/DPK20	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	6-1-1
L2/DPK21	E	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	2-1-1
L6	E	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	2-1-1
L20	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	2-1-x
L35/DPK23	E	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	6-1-1
B2/DPK24	E	I	L	T	O	S	P	A	F	M	2-1-1
B2	E	I	L	T	O	S	P	A	F	M	2-1-1
A26/DPK26	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	2-1-1
A10/DPK26	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	2-1-1
A14/DPK25	D	V	M	T	Q	S	P	A	F	M	2-1-1

Figura 2

Figura 3

	1	2	3	4	5	
	0	0	0	0	0	
DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQOKQKSPOLLVYYTTLAD						D1.3 Vκ
L23			SqgIssY		Yas	
A14/DPK25			SegIqNY		Yas	
L1			SqgIsNY		aaa	
O12/DPK9			SqsIssY		aaa	
O18/DPK1			SqdIsNY		das	
A30			SqgIrNd		aaa	
L14/DPK2			rqgIsNY		aaa	
L4			SqgIssa		aaa	
L8/DPK8			SqgIssY		aaa	
L9			SqgIssY		aaa	
L18			SqgIssa		aaa	
L15/DPK7			SqgIssw		aaa	
L5/DPK5			SqgIssw		aaa	
L11/DPK3			SqgIrNd		aaa	
B2			SqdIddd		eaT	
L24/DPK10			SqgIssy		aaa	
L12			SqsIssw		aaa	
L6			SqsvssY		das	
A26/DPK26			SqsIqss		Yas	
L16			Sqsvssn		asT	
L2/DPK21			Sqsvssn		gas	
	6	7	8	9	10	
	0	0	0	0	0	8
GVPSPRFGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGSYQCQHFNSTPRTFGGGKLEIKR						D1.3 Vκ
L23				yySTP		
A14				gnkhP		
L1				ynSyP		
O12				sySTP		
O18				ydn1P		
A30				hnSyP		
L14				hnSyP		
L4				FnSyP		
L8				lnSyP		
L9				yySyP		
L18				FnSyP		
L15				ynSyP		
L5				anSfP		
L11				dynyP		
B2				hdnfP		
L24/DPK10				yySfP		
L12				ynSys		
L6				rsnwP		
A26				ssSlP		
L16				yynnwP		
L2				yynnwP		
J1				wTFGqGTKvEIKR		
J2				yTFGqGTKLEIKR		
J3				fTFGpGTKvdIKR		
J4				lTFGGGTKvEIKR		
J5				iTFGqGTRLEIKR		

Figura 4

1 2 3 4 5 6
 0 0 0 0 0 0
QVQLQESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTGYGVNWVRQPPGKGLEWLGMIWGDGNTDYNSALKS

VH de D1.3

Tou-VH4.21	gSfsGYyws	eIihsGsTnYNpsLKS
DP-63	gSfsGYyws	eInhsGsTnYNpsLKS
V58	gSvsGYyws	yIyysGsTnnNpsLKS
VIV-4	gSissYyws	rIytsGsTnYNpsLKS
DP-71	gSissYyws	yIyysGsTnYNpsLKS
V71-4	gSvssYyws	yIyysGsTnYNpsLKS
VH4.16	gSissYyws	yIyysGsTnYNpsLKS
DP-45	FtfssYamh	aIgtgGgTyYadsvKg
DP-48	FtfssYdmh	aIgtgGgTyYadsvKg
DP-42	Ftvssnmys	vIyysGsTyYadsvKg
8-1B	Ftvssnmys	vIyysGsTyYadsvKg

7 8 8 8 9 10 11
 0 0 2abc3 0 0 0
RLSISKDNSKSQVFLKMNSLHTDDTARYYCARERDYRLDYWGQGTTLTVSS VH de D1.3

JH1	aeyfqhWGQGTTLTVSS
JH2	ywyfDIWGRGTLTVSS
JH3	afDvWGQGTMTVTVSS
JH4	yfDYWGQGTTLTVTVSS
JH5	nwfDsvWGQGTTLTVTVSS
JH6	yyydYgmDvWGQGTTLTVTVSS

Figura 5

	1	2	3	4	5	
	0	0	0	0	0	
	<u>DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNIHNYLAWYQOKGKSPQLLVYTTTLAD</u>					Vk de D1.3 de ratón
	AIRMTQSPFSLASVGDRTITCRASGNIHNYLAWYQOKPAKAPKLFYTTTLAD					Vk de D1.3 humanizado

	6	7	8	9	10	10	
	0	0	0	0	0	8	
	<u>GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLOPEDFGSYQCQHFWSLTPRTFSGGKLEIKR</u>						Vk de D1.3 de ratón
	GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQHFWSLTPRTFSGGKVEIKR						Vk de D1.3 humanizado

	1	2	3	4	5	6	
	0	0	0	0	0	0	
	<u>QVQLQESGPGLVAPSSQSLITCTVSGFSLTGYGVNWVRQPPGKLEWLGMIWGDGNTDYNSSALKS</u>						VH de D1.3 de ratón
	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSGYGVNWIRQPPGKLEWIGMIWGDGNTDYNSSLKS						VH de D1.3 humanizado

	7	8	8	8	9	10	11	
	0	0	2	abc3	0	0	0	
	<u>RLSISKDNKSKQVFLKMNSLHTDDTARYYCARERDYRLDYWGQGTTLTVSS</u>							VH de D1.3 de ratón
	RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGTTLTVSS							VH de D1.3 humanizado

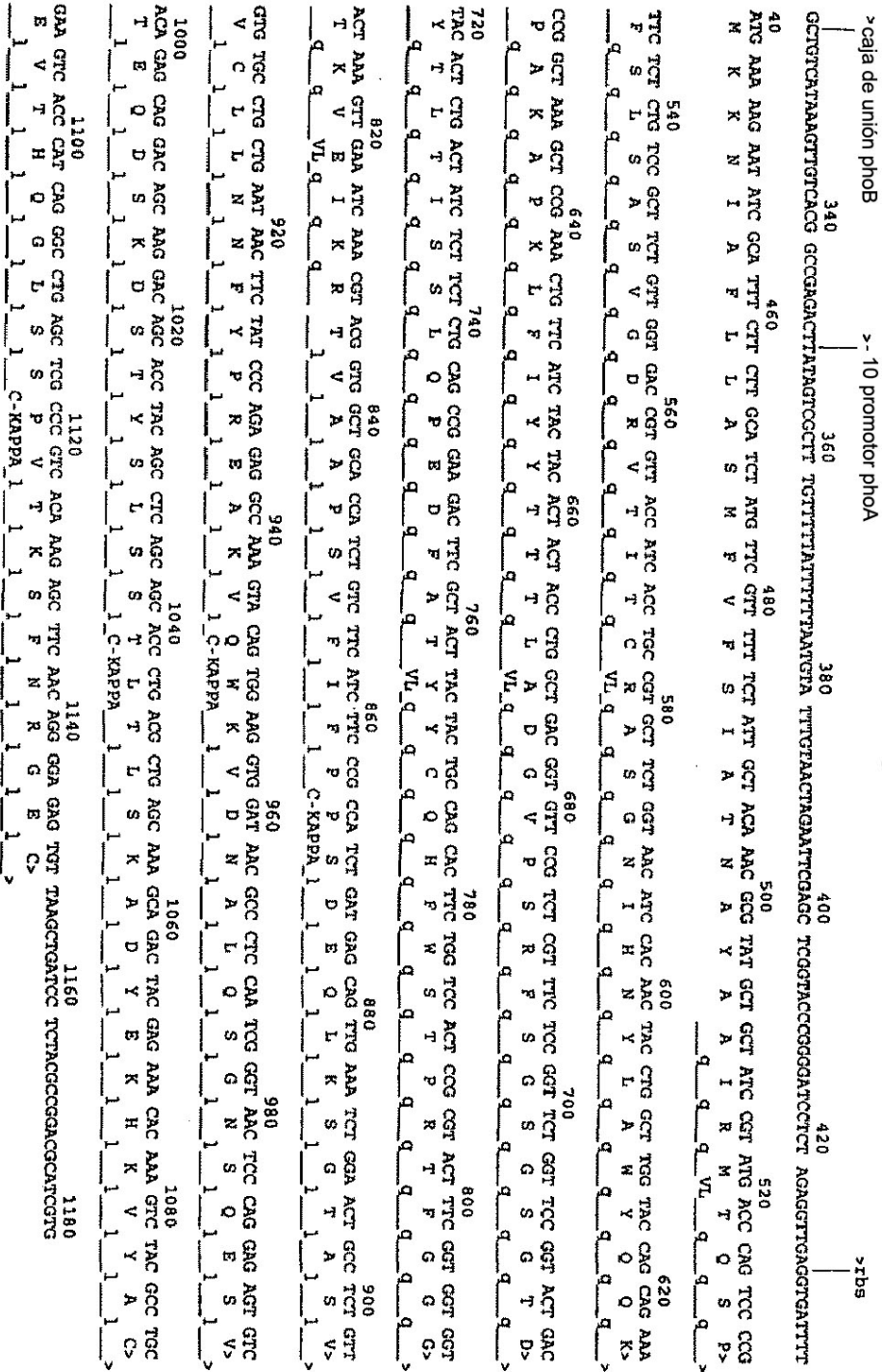


Figura 6

```

1200
GCCCTTATACAGAGTTCAC GTTAAAGAGGATATCAGAGG TTGAGGTGATTTT ANG AAA ANG AAT ATC GCA TTT CTT GGA TCT ATG TTC GTT TTT TCT ATT
1220
1240
1260
1280
>rls
1300
GCT ACA AAC GCG TAC GAT CAG GTT CAG CTG CAG GAA TCT GGT CCG GGT CTG GTT AAA CGG TCT GAA ACT CTG TCT CTG ACT TGC ACT GTT TCT
1320
1340
1360
1380
GGT GGT TCT GTT TCT GAT TAC GGT AAC TGG ATC CGT GAT CCG GGT AAA GGT CTG GAA TGG ATC GGT ATG ATC TGG GGT GAC GGT AAC
1400
1420
1440
1460
G G S V S G Y G V N W I R Q P P G K G L E W I G M I W G D G N>
1480
1500
1520
1540
1560
ACT GAC TAC AAC TCT TCT CTG AAA TCT GGT ACT ATC TCT GTC GAC ACT TGT AAA AAC CAG TTC TCT CTG AAA CTG TCT TCT GTT ACT GCT
1580
1600
1620
1640
1660
GCT GAC ACT GCT GTT TAC TAC TGC GCT CGT GAA CGT GAC TAC CGT CTG GAC TAC TGG GGT CAG GGT ACT CTG GTT ACT GTT TCT GCC TCC
1680
1700
1720
1740
1760
1780
1800
1820
1840
CCC GAA CCG GTG ACG GTG TGG TGG AAC TCA TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTC CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC
1860
1880
1900
1920
1940
1960
1980
2000
2020
2040
P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S>
1960
1980
2000
2020
2040
CTC AGC AGC GTG GTG ACC GTC CCC TCC AGC AGC AGC CTG ACC AGC GGC GTC CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC
1980
2000
2020
2040
L S S V V T V P S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D>
1960
1980
2000
2020
2040
AAG AAA GTT GAG CCG AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC GCC GCG GCA CCGGACAGCGAGG GCCCTAAGATGCCCTAAGGCT CCGTTCGCCCGGCGCTTTT
1980
2000
2020
2040
K K V E P K S C D K T H T C A A A *>
1960
1980
2000
2020
2040
TTATTCGTAA
>terminador de fago lambda

```


Figura 7

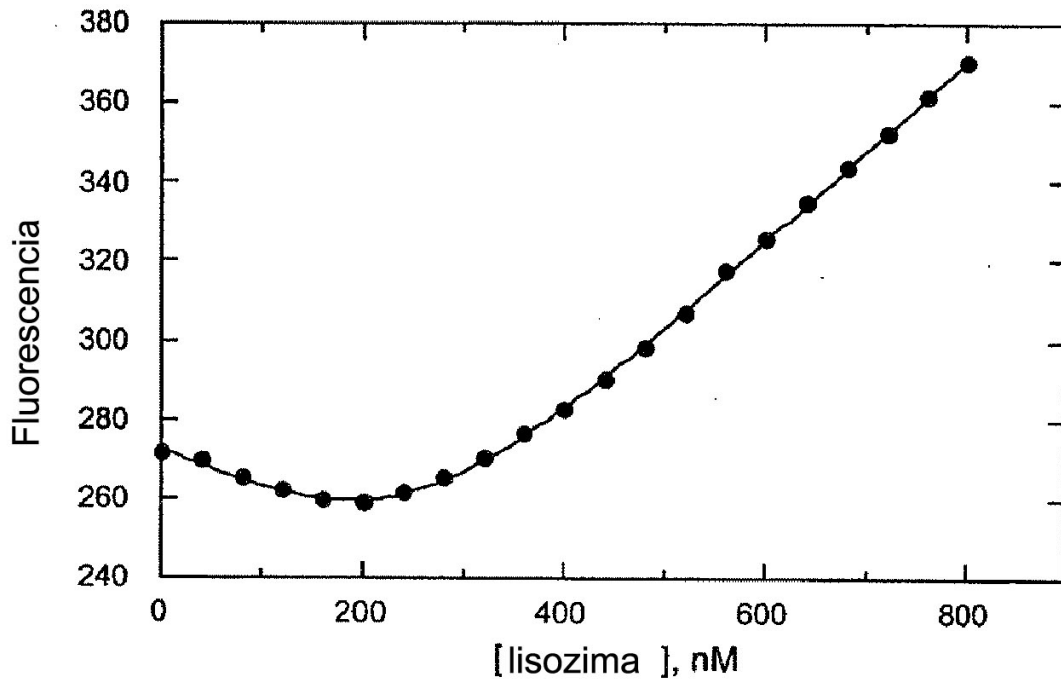


Figura 8

1 2 2 3 4 5
 0 0 7abcd 0 0 0
DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEY YVTSLMQWYQQKPGQPPKLLIFAAASNVES Vk de 9,3

B3/DPK24	ksSqSVlYsnnknyla	wAStrES
A17/DPK18	RsSqSlvYs dgntyln	kvSNrdS
A1/DPK19	RsSqSlvYs dgntyln	kvSNwds
A2/DPK12	ksSqSllhs dgktyly	evSNrfs
A19/DPK15	RsSqSllhs ngynyld	lgSNras
A23/DPK16	RsSqSlvhs dgntyls	kiSNrfs
O11/DPK13	RsSqSllsddgntyl	tiSyras
A18/DPK28	ksSqSllhs dgvtly	evSsrfs

6 7 8 9 10 10
 0 0 0 0 0 8
GVPARFSGSGGTNPSLNHPVDEDDVAMYFCQSRKVPYTFGGGTKLEIKR Vk de 9,3

B3/DPK24	QQyystP
A17/DPK18	mQgthwP
A1/DPK19	mQgthwP
A2/DPK12	mQSiqlP
A19/DPK15	mQalqtP
A23/DPK16	mQatqfP
O11/DPK13	mQriefP
A18/DPK28	mQgthlP
J1	wTFGqGTRvEIKR
J2	YTFGqGTKLEIKR
J3	fTFGpGTKvdIKR
J4	lTFGGGTRvEIKR
J5	iTFGqGTRLEIKR

Figura 9

	1	2	3	4	5	6	
	0	0	0	0	0	0	
	<u>EVKLQQSGPGLVTPSQSL SITCTVSGFSLSDYGVHWVRQSPGQGLEWLGVIWAGGCTNYNSALMS</u>						VH de 9,3
DP-45			Ft fSs YamH			a IgtGGGTYadsvKg	
Tou-VH4.21			gSfSgYyws			eIiheGsTNYNpsLKS	
DP-63			gSfSgYyws			eInhsGsTNYNpsLKS	
VIV-4			gSiSsYyws			rIytsGsTNYNpsLKS	
DP-71			gSiSsYyws			yIyysGsTNYNpsLKS	
V71-4			gSvSsYyws			yIyysGsTNYNpsLKS	
VH4.16			gSiSsYyws			yIyysGsTNYNpsLKS	
DP-48			Ft fSs YdmH			aIgt aGdTYp gsvKg	
DP-42			FtvSsnymS			VIysGGsTYadsvKg	
8-1B			FtvSsnymS			VIysGGsTYadsvKg	
V58			gSvSgYyws			yIyysGsTnnNpsLKS	

	7	8	8	8	9	10	11	
	0	0	2	abc3	0	0	abcd	
	<u>RKSISKDNSKSQVFLKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSM DYWGQGT SVTVSS</u>							VH de 9,3

JH1	aeyfqhWGQGTlVTVSS
JH2	ywyfDlWGrGtlVTVSS
JH3	aFDvWGQGTmVTVSS
JH4	yfDYWGQGTlVTVSS
JH5	nwfDeWGQGTlVTVSS
JH6	YSYdYgMDvWGQGTtVTVSS

Figura 10

1	2	2	3	4	5	
0	0	7abcd	0	0	0	
DIELTQSPASLAVSLGORATISCRASESVEYYVTSLMQWYQOKPGQPPKLLI PAASNVES						Vk de 9,3 de ratón
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASESVEYYVTSLMAWYQOKPGQPPKLLI YAASNVES						Vk de 9,3 humanizado

6	7	8	9	10	10	
0	0	0	0	0	6	
GVPARFSGSGSGTNFSLNIHPVDEDDVAMYFCQOSRKVPYTFGGTKLEIKR						Vk de 9,3 de ratón
GVPDFRFGSGSGTNFSLTISSLQAEDVAVYYCQOSRKVPYTFGGTKLEIKR						Vk de 9,3 humanizado

1	2	3	4	5	6	
0	0	0	0	0	0	
EVKLQSGPGLVTPSQSLSIITCTVSGFSLSDYGVHWVRQSPGGLEWLGV IWAGGGTNYNSALMS						VH de 9,3 de ratón
EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSDYGVHWVRQAPGKLEWVSA IWAGGGTNYASSVMG						VH de 9,3 humanizado

7	8	8	8	9	10	11	
0	0	2abc	3	0	0abcd	0	
RKSISKDNSKSOVFLKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGT SVTVSS							VH de 9,3 de ratón
RFTISRDNAAKNSLYLQMNLSLRAEDMAVYYCARDKGYSYYYSMDYWGQGT LVTVSS							VH de 9,3 humanizado

Figura 11

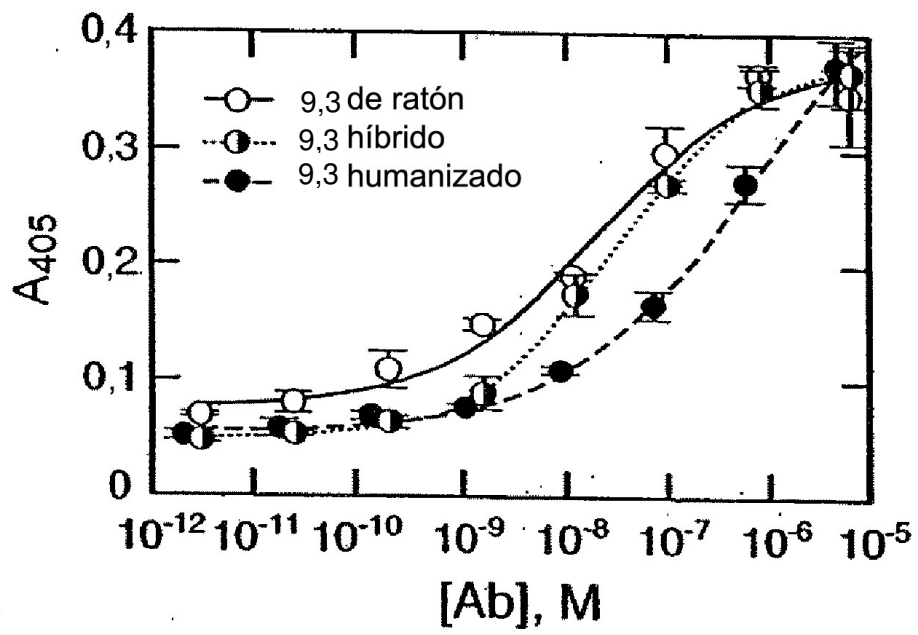


Figura 12

1	2	2	3	4	5	
0	0	<u>7abcd</u>	<u>0</u>	0	<u>0</u>	
DIVLTQSPVSLAVSVGQRATISCKASQSVDFDGESYMNWYQOKPGOPPQLLIYVVSNLES						Vk de BCF2 de ratón
DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKASQSVDFDGESYMNWYLQKPGOPPQLLIYVVSNLES						Vk de BCF2 humanizado
6	7	8	9	10	10	
0	0	0	<u>0</u>	0	8	
GIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCOQSNEDPLTFGAGTNLELKR						Vk de BCF2 de ratón
GVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDVGVVYCOQSNEDPLTFGGGYKVEIKR						Vk de BCF2 humanizado
1	2	3	4	5	5	6
0	0	<u>0</u>	0	0	<u>2a</u>	0
EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKVSGYSPFDHTMNVVVKQSHGKNLELIGLINPFNGDATYKQKFTG						Vh de BCF2 de ratón
EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFDHTMNVVQAPGKGLEWMGLINPFNGDATYKQKPFQ						Vh de BCF2 humanizado
7	8	8	9	10	11	
0	0	<u>2abc3</u>	0	0	0	
KATLTVDRSSSTAFMELLSLTSSEDSAVYYCARYGNYAMDYWGQTSVTVSS						Vh de BCF2 de ratón
RVITITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYGNYAMDYWGQTTVTVSS						Vh de BCF2 humanizado

Figura 13

1	2	2	3	4	5		
0	0	7abcde	0	0	0		
**VLTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSLEHNNNGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRFS						Vk de NGAD65 de ratón	
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLEHNNNGNTYLNWYFQRRPGQSPRRLIYRVSNRFS						Vk de NGAD65 humanizado	
6	7	8	9	10	10		
0	0	0	0	0	8		
GGLDRPFGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCLQVTHVPFFFGSGTKLEIKR						Vk de NGAD65 de ratón	
GVPDRPFGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYICLQVTHVPFFFGPGTKVDIKR						Vk de NGAD65 humanizado	
1	2	3	4	5	5	5	6
0	0	0	0	0	2a	6	0
QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYRFSYINMHVVKQTPGQGLEWIGAIYPRSGDTSYN							VH de NGAD65 de ratón
EVQLLQSAAEVKRPGESLRISCKTSGYSFTSYINMHVVRQMPGKELEWMGAIYPRSGDTSYN							VH de NGAD65 humanizado
7	8	8	8	9	9	10	11
0	0	2abc3	0	4	0ab	0	0
QKFKGKATLTADKSSSTAYMQLGSLTSEDSAVYYCVRSYDYDAPFAFWGQGLVTVSA							VH de NGAD65 de ratón
PSFQGHVTTISADSSSSTAYLQWSSLKASDAAMYYCVRSYDYDAPFAFWGQGLVTVSS							VH de NGAD65 humanizado

Figura 14

