

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 357**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2004 E 04794837 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 1670828**

54 Título: **Anticuerpos enteramente humanos contra 4-1BB humano (CD137)**

30 Prioridad:

10.10.2003 US 510193 P
08.10.2004 US 961567

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.12.2013

73 Titular/es:

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
ROUTE 206 & PROVINCE LINE ROAD
PRINCETON, NJ 08543-4000, US

72 Inventor/es:

JURE-KUNKEL, MARIA;
HEFTA, LAURA, J.;
SANTORO, MARC;
GANGULY, SUBINAY y
HALK, EDWARD, L.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 432 357 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 enteramente humanos contra 4-1BB humano (CD137)

Campo de la invención

5 La invención está dirigida a anticuerpos enteramente humanos y, más específicamente, a los anticuerpos enteramente humanos frente a 4-1BB humano (CD137).

Antecedentes de la invención

Un amplio cuerpo de evidencias ha demostrado de forma inequívoca que existe cierto grado de respuesta inmune contra el cáncer en seres humanos y en animales. En los pacientes de cáncer, los componentes celulares del sistema inmune son capaces de reconocer los antígenos expresados por las células tumorales, tales como diferenciación de antígenos oncofetales o productos génicos mutados (S. Rosenberg, *Nature*, 411: 380-4 (2001); P. van der Bruggen y col., *Immunological Rev.*, 188: 51-64 (2002)). Un número de estudios clínicos ha mostrado que la infiltración de linfocitos en el tumor tiene un significado de pronóstico favorable (E. Halapi, *Med. Oncol.*, 15(4): 203-11 (1998); Y. Naito y col., *Cancer Res.*, 58(16): 3491-4 (1998); L. Zhang y col., *N.E. J. Med.*, 348(3): 203-13 (2003)). Además, el tratamiento con inmunomoduladores, tales como las citoquinas o productos bacterianos, vacunas contra el cáncer o inmunoterapia adoptiva ha llevado a la regresión del tumor en un número de pacientes (S. Rosenberg, *Cancer J. Sci. Am.* 6(S): 2 (2000); P. Bassi, *Surg. Oncol.*, 11(1-2): 77-83 (2002); S. Antonia y col., *Current Opinion in Immunol.*, 16: 130-6 (2004)). A pesar de estas respuestas, la inmunidad contra el cáncer fracasa frecuentemente en la eliminación eficaz de las células tumorales. Las causas de este fracaso se pueden agrupar en tres categorías principales: (i) incapacidad de reconocimiento del tumor por parte de las células inmunes, bien por la expresión variable de los antígenos tumorales o por la expresión reducida del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMH); (ii) microentorno tumoral inmunosupresor, como resultado de la secreción de citoquinas inhibitorias por las células tumorales (por ejemplo, TGF- β); y (iii) inmunogenicidad tumoral escasa debido a la falta de expresión de moléculas coestimuladoras en las células tumorales, lo que da lugar a la incapacidad de las células tumorales de estimular eficazmente a las células T. Los avances en nuestra comprensión de las necesidades para el reconocimiento de los antígenos tumorales y la función efectora inmune indican que una estrategia potencial para aumentar una respuesta inmune antitumoral es proporcionar una coestimulación por medio de una molécula auxiliar. Las células T específicas contra los antígenos tumorales necesitan la coestimulación para iniciar y mantener las funciones efectoras. Por tanto, pueden aplicarse terapias que dirigen moléculas coestimuladoras para modular y mejorar la respuesta inmune contra los tumores.

30 El modelo actual de activación de las células T postula que las células T intactas necesitan dos señales para activarse plenamente: (i) una señal proporcionada a través de la unión de los antígenos procesados presentados al receptor de la célula T por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMH); y (ii) una señal adicional proporcionada por la interacción de moléculas coestimuladoras sobre la superficie de las células T y sus ligandos sobre las células presentadoras de antígeno. El reconocimiento de un antígeno por una célula T intacta es insuficiente por sí mismo para desencadenar la activación de la célula T. Sin una señal coestimuladora, las células T pueden eliminarse bien sea por muerte o por inducción de anergia. La señalización por medio de la molécula coestimuladora CD28 parece ser la clave para el inicio de las respuestas de la célula T. Sin embargo, la señalización de CD137 (4-1BB) ha demostrado ser primordial para el mantenimiento y la expansión de la respuesta inmune frente a antígenos, así como también para la generación de la memoria de las células T.

40 CD137 (4-1BB) es un miembro de la familia génica del receptor de necrosis tumoral (TNF-R), que incluye proteínas que están implicadas en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación y la muerte celular programada. CD137 es una glucoproteína de membrana de tipo I de 30 kDa que se expresa como un homodímero de 55 kDa. El receptor se describió inicialmente en ratones (B. Kwon y col., *P.N.A.S. EE.UU.*, 86: 1963-7 (1989)) y más tarde se identificó en seres humanos (M. Alderson y col., *Eur. J. Immunol.*, 24: 2219-27 (1994); Z. Zhou y col., *Immunol. Lett.*, 45: 67 (1995)) (Véanse también, las solicitudes PCT publicadas WO95/07984 y WO96/29348 y la Patente de Estados Unidos N° 6.569.997, (Véase, SEC ID N°: 2.)). Las formas humana y murina de CD137 son idénticas en el 60% a nivel de aminoácidos. Las secuencias conservadas aparecen en el dominio citoplasmático, así como otras 5 regiones de la molécula, lo que indica que estos restos pueden ser importantes para la función de la molécula de CD137 (Z. Zhou y col., *Immunol. Lett.*, 45: 67 (1995)). La expresión de CD137 ha mostrado estar predominantemente en las células de linaje linfocitario tales como las células T activadas, los linfocitos citotóxicos naturales activados (NK), células NKT, células T reguladoras de CD4CD25 y también en timocitos activados y linfocitos intraepiteliales. Además, CD137 ha mostrado que se expresa en las células de origen mieloide como las células dendríticas, monocitos, neutrófilos y eosinófilos. Aunque la expresión de CD137 está limitada principalmente a las células inmunitarias/inflamatorias, existen informes que describen su expresión en células endoteliales asociadas con un pequeño número de tejidos de sitios inflamatorios y tumores.

Las actividades funcionales de CD137 en las células T se han caracterizado ampliamente. La señalización por medio de CD137 en presencia de dosis subóptimas de anti-CD3 ha mostrado que induce la proliferación de células T y la síntesis de citoquinas (principalmente IFN- γ), e inhibe la muerte de las células activadas. Estos efectos se han observado en células T tanto humanas como murinas (W. Shuford y col., *J. Exp. Med.*, 186(1): 47-55 (1997); D.

Vinay y col., *Semin. Immunol.*, 10(6): 481-9 (1998); D. Laderach y col., *Int. Immunol.*, 14(10): 1155-67 (2002)). Tanto en seres humanos como en ratones, la coestimulación aumenta las funciones efectoras, tales como la producción de IFN- γ y la citotoxicidad, mediante el aumento del número de células T específicas de antígeno y efectoras CD8+. En ausencia de la señalización anti-CD3, la estimulación por medio de CD137 no altera la función de las células T, lo que indica que CD137 es una molécula coestimuladora.

Los acontecimientos fisiológicos que se observan a continuación de la estimulación de CD137 sobre las células T están mediados por señales de NF- κ B y PI3K/ERK1/2 con funciones fisiológicas separadas. Las señales de NF- κ B desencadenan la expresión de Bcl- χ L, una molécula antiapoptótica, resultando así en un aumento de la supervivencia, mientras que las señales de PI3K y ERK1/2 son responsables específicamente de la progresión del ciclo celular mediado por CD137 (H. Lee y col., *J. Immunol.*, 169(9): 4882-8 (2002)). El efecto de la activación de CD137 sobre la inhibición de muerte celular inducida por activación se ha demostrado *in vitro* por Hurtado y col. (*J. Immunol.*, 158 (6): 2600-9 (1997)) y en un sistema *in vivo* en el que se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales anti-CD137 (mab) daban lugar a la supervivencia a largo plazo de las células T CD8+ activadas por superantígeno previniendo la supresión clónica (C. Takahashi y col., *J. Immunol.*, 162: 5037 (1999)). Posteriormente, dos informes demostraron, en diferentes condiciones experimentales, que la señal de CD137 regulaba tanto la expansión clónica como la supervivencia de las células T CD8+ (D. Cooper y col., *Eur. J. Immunol.*, 32(2): 521-9 (2002); M. Maus y col., *Nat. Biotechnol.*, 20: 143 (2002)). La reducción de la apoptosis que se observó tras la coestimulación estaba correlacionada con el aumento de los niveles de Bcl- χ L en células T CD8+, mientras que la expresión de Bcl-2 permanecía sin cambios. Se demostró que la regulación positiva de los genes antiapoptóticos Bcl- χ L y bfl-1 por medio de 4-1BB estaba mediada por la activación de NF- κ B, ya que PDTC, un bloqueante específico de NF- κ B inhibía la regulación positiva de Bcl- χ L mediada por 4-1BB (H. Lee y col., *J. Immunol.*, 169(9): 4882-8 (2002)). Por otro lado, la expansión clónica de las células T activadas parece que está mediada por el aumento de la expresión de ciclinas D2, D3 y E y la regulación negativa de la proteína p27^{kip1}. Este efecto ocurre tanto de manera dependiente como independiente de la IL-2 (H. Lee y col., *J. Immunol.*, 169(9): 4882-8 (2002)).

En general, la estimulación por CD137 da como resultado el aumento de la expansión, la supervivencia y las funciones efectoras de las células T CD8+ estimuladas por primera vez, actuando, en parte, directamente sobre estas células. Las células T tanto CD4+ como CD8+ han mostrado respuestas a la estimulación por CD137, sin embargo, parece que la mejoría de la función en las células T es mayor en las células CD8+ (W. Shuford y col., *J. Exp. Med.*, 186(1): 47-55 (1997); I. Gramaglia y col., *Eur. J. Immunol.*, 30(2): 392-402 (2000); C. Takahashi y col., *J. Immunol.*, 162: 5037 (1999)). Basándose en el papel crítico de estimulación por CD137 en la función y la supervivencia de las células T CD8+, la manipulación del sistema CD137/CD137L proporciona una estrategia plausible para el tratamiento de tumores y virus patógenos.

Recientemente, la expresión constitutiva de CD137 en células dendríticas (CD) recién aisladas se ha demostrado en ratones (R. Wilcox y col., *J. Immunol.*, 169(8): 4230-6 (2002); T. Futagawa y col., *Int. Immunol.*, 14(3):275-86 (2002)) y en seres humanos (S. Pauly y col., *J. Leukoc. Biol.* 72(1): 35-42 (2002)). Estos informes muestran que la estimulación por CD137 en las CD da como resultado la secreción de IL-6 e IL-12, y, más importante, mejora la capacidad de las CD para estimular las respuestas de las células T a los aloantígenos. Además, Pan y col., demostraron que la señalización de CD137 en las CD daba como resultado la regulación positiva del CMH de Clase I y las moléculas coestimuladoras y producía un aumento de la capacidad de las CD para infiltrarse en los tumores (P. Pan y col., *J. Immunol.*, 172(8): 4779-89 (2004)). Por tanto, la coestimulación por CD137 sobre las CD parece ser una ruta novedosa de proliferación, maduración y migración de CD.

Los linfocitos citolíticos naturales (NK) activados expresan CD137 después de la estimulación con citoquinas (I. Melero y col., *Cell Immunol.*, 190(2): 167-72 (1998); R. Wilcox y col., *J. Immunol.*, 169(8): 4230-6 (2002)). Varios informes han demostrado que las células NK parecen ser críticas para la modulación de la respuesta inmune antitumoral inducida por anticuerpos agonistas CD137 ((I. Melero y col., *Cell Immunol.*, 190(2): 167-72 (1998); R. Miller y col., *J. Immunol.*, 169(4): 1792-800 (2002); R. Wilcox y col., *J. Immunol.*, 169(8): 4230-6 (2002)). El agotamiento de las células NK reduce significativamente la actividad antitumoral de los mab anti-CD137. La unión de CD137 sobre las células NK induce la proliferación y la secreción de IFN- γ , pero no afecta su actividad citolítica. En particular, *in vitro*, las células NK estimuladas por CD137 presentaban una actividad inmunorreguladora o "auxiliar" para las células T CD8+ citolíticas que daba como resultado la expansión de las células T activadas. Por lo tanto, la señalización de CD137 sobre las células NK puede modular la inmunidad innata frente a los tumores.

Se ha descrito un efecto paradójico para la estimulación por CD137 en el que los anticuerpos agonistas CD137 pueden inducir la supresión de las respuestas humorales frente a antígenos de células T en modelos de primates y ratones (H. Hong y col., *J. Immunother.*, 23(6): 613-21 (2000); R. Mittler y col., *J. Exp. Med.*, 190(10): 1535-40 (1999)). En particular, se ha demostrado que los anticuerpos agonistas CD137 producían una mejoría significativa de los síntomas asociados con las enfermedades autoinmunes dependientes de anticuerpos, tales como el lupus eritematoso sistémico y la encefalomiелitis autoinmune experimental (J. Foell y col., *N.Y. Acad. Sci.*, 987: 230-5 (2003); Y. Sun y col., *Nat. Med.*, 8(12): 1405-13 (2002)). Recientemente, Seo y col. demostraron que, en un modelo de artritis reumatoide de ratón, el tratamiento con un anticuerpo agonista anti-CD137 prevenía el desarrollo de la enfermedad y de manera extraordinaria, bloqueaba la progresión de la enfermedad (S. K. Seo y col., *Nat. Med.* 10;

- 1099-94 (2004)). El mecanismo responsable de este efecto no se ha definido bien, pero en el modelo de artritis reumatoide se ha demostrado que el tratamiento con un anticuerpo agonista de CD 137 daba como resultado la expansión de las células T CD11C-CD8+ productoras de IFN- γ . El IFN- γ a su vez estimulaba las células dendríticas para producir indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), que tiene actividades inmunosupresoras. También se ha postulado que la señalización de CD137 sobre las células T CD4+ activadas por antígeno da como resultado la inducción de la secreción de IFN- γ que activa los macrófagos. Los macrófagos activados pueden a su vez producir señales de muerte para las células B. La señalización continua a través de CD137 sobre las células T CD4+ puede posteriormente provocar la muerte celular inducida por activación (AICD) de estas células T CD4+ activadas. Por tanto, eliminando las células T activadas por antígeno y las células B, se observa una reducción de la respuesta por anticuerpos y en consecuencia, se observa una reducción drástica de las enfermedades inflamatorias mediadas por Th2 (B. Kwon y col., J. Immunol., 168(11): 5483-90 (2002)). Estos estudios sugieren un papel para el uso de anticuerpos agonistas CD137 en el tratamiento de enfermedades inflamatorias o autoinmunes, sin inducir una supresión general del sistema inmune.
- El ligando natural de CD137, ligando de CD137 (CD137L), una glucoproteína de 34 kDa miembro de la superfamilia del TNF, se detecta principalmente en las células presentadoras de antígeno activadas (CPA), tales como las células B, los macrófagos, células dendríticas y también en los linfomas de células B murinos, células T activadas y líneas de carcinoma humano de origen epitelial (R. Goodwin y col., Eur. J. Immunol., 23(10): 2631-41 (1993); Z. Zhou y col., Immunol. Lett., 45: 67 (1995); H. Salih y col., J. Immunol., 165(5): 2903-10 (2000)). El CD137L humano comparte el 36% de homología con su homólogo murino (M. Anderson y col., Eur. J. Immunol., 24: 2219-27 (1994)).
- Además de suministrar señales a las células que expresan CD137, la unión de CD137 al CD137L inicia una señal bidireccional que da como resultado efectos funcionales sobre las células que expresan CD137L. Langstein y col. demostraron que la unión de la proteína de fusión CD137-Ig al CD137L en monocitos activados inducía la producción de IL-6, IL-8 y TNF- α , regulaba positivamente la ICAM, e inhibía la IL-10, dando como resultado aumento de la adherencia (J. Langstein y col., J. Immunol., 160(5): 2488-94 (1998)). Además, se ha demostrado una proliferación de monocitos acompañada por una tasa más alta de apoptosis (J. Langstein y col., J. Leukoc. Biol., 65(6): 829-33 (1999)). Estas observaciones se confirmaron con los estudios de Ju y col. (S. Ju y col., Hybrids Hybridomics, 22(5): 333-8 (2003)), que mostraron que un anticuerpo funcional anti-CD137L inducía una alta tasa de proliferación de los monocitos de sangre periférica. El bloqueo del ligando daba como resultado la inhibición de la activación de las células T. Además se descubrió CD137L soluble en el suero de pacientes con artritis reumatoide y procesos hematológicos malignos (H. Salih y col., J. Immunol., 167(7): 4059-66 (2001)). Por tanto, la interacción de CD137 con CD137L tiene influencia y produce efectos funcionales en las células T y las CPA.
- En otro aspecto importante de la función de las células T, se ha demostrado que los anticuerpos agonistas anti-CD137 rescataban respuestas de las células T frente a las proteínas antigénicas en ratones viejos. Se ha documentado bien que se produce un declive relacionado con la edad en la respuesta inmune frente a los antígenos, un proceso conocido como inmunosenescencia (R. Miller, Science, 273: 70-4 (1996); R. Miller, Vaccine, 18: 1654-60 (2000); F. Hakim y col., Curr. Opin Immunol., 16: 151-156 (2004)). Este fenómeno parece que se debe a alteraciones en el equilibrio entre la extensión de la expansión celular y la supervivencia o muerte celular. Bansal-Pakala y col. ensayaron la hipótesis de que la coestimulación secundaria por medio de CD137 se puede utilizar para potenciar las respuestas de las células T en situaciones en las que las células T no reciben una estimulación suficiente, debido a la reducción de la expresión de CD3 o CD28 o a la reducción de la calidad de las señales. Sus estudios mostraron que los ratones viejos tenían una respuesta de memoria deficiente *in vitro* en comparación con los ratones jóvenes (P. Bansal-Pakala y col., J. Immunol., 169(9): 5005-9 (2002)). Sin embargo, cuando los ratones viejos se trataron con mab anti-CD137, las respuestas proliferativas y de citoquinas de las células T fueron idénticas a las respuestas que se observaban en los ratones jóvenes. Aunque no se ha elucidado el mecanismo específico responsable de este efecto, se ha especulado que el aumento tanto de la expresión de las moléculas antiapoptóticas como Bcl- XL como la promoción de la secreción de IL-2 *in vivo* puede tener un papel en el rescate de las respuestas de células T defectuosas. Estos estudios demostraron el potencial de los anticuerpos agonistas anti-CD137 para rescatar las respuestas débiles de las células T en los individuos ancianos inmunocomprometidos y tienen profundas implicaciones para el uso de anticuerpos anti-CD137 en los pacientes con cáncer.
- Se sugirió que la terapia dirigida de CD137 tenía un papel en el tratamiento del cáncer por los estudios de eficacia *in vivo* en ratones utilizando anticuerpos monoclonales agonistas anti-CD137 murino. En un artículo de Melero y col., el anticuerpo agonista anti-CD137 de ratón produjo curaciones en tumores de mastocitoma P815 y en el modelo de tumor de baja inmunogenicidad Ag104 (I. Melero y col., Nat. Med., 3(6): 682-5 (1997)). El efecto antitumoral necesitaba de células T tanto CD4+ como CD8+ como células NK, puesto que el agotamiento selectivo *in vivo* de cada subpoblación dio como resultado la reducción o pérdida completa del efecto antitumoral. Se ha demostrado también que era necesaria una inducción mínima de la respuesta inmune para que la terapia fuera eficaz. Varios investigadores han utilizado anticuerpos anti-CD137 para demostrar la viabilidad de esta estrategia en el tratamiento del cáncer (J. Kim y col., Cancer Res., 61(5): 2031-7 (2001); O. Martinet y col., Gene Ther., 9(12): 786-92 (2002); R. Miller y col., J. Immunol., 169(4): 1792-800 (2002); R. Wilcox y col., Cancer Res., 62(15): 4413-8 (2002)).
- Apoyando los datos de la eficacia antitumoral de los anticuerpos agonistas CD137, se ha demostrado que las señales proporcionadas por el CD137L provocan la actividad de CTL y respuestas antitumorales (M. DeBenedette y col., J. Immunol., 163(9): 4833-41 (1999); B. Guinn y col., J. Immunol., 162(8): 5003-10 (1999)). Varios informes

demostraron que la transferencia génica del ligando de CD137 en carcinomas murinos daba como resultado el rechazo del tumor, demostrando la necesidad de la coestimulación para generar una respuesta inmune eficaz (S. Mogi y col., *Immunology*, 101(4): 541-7 (2000); L. Melero y col., *Cell Immunol.*, 190(2): 167-72 (1998); B. Guinn y col., *J. Immunol.*, 162(8): 5003-10 (1999)). Salih y col. informaron de la expresión del CD137L en carcinomas humanos y líneas celulares de carcinoma humano (H. Salih y col., *J. Immunol.*, 165(5): 2903-10 (2000)) y demostraron que las células tumorales que expresaban el ligando eran capaces de aportar una señal coestimuladora a las células T que daba como resultado la liberación de IFN- γ e IL-2 y que este efecto estaba correlacionado con los niveles de CD137L en los tumores. No se sabe si la expresión de CD137L en tumores humanos podría hacer a estos tumores más susceptibles a los anticuerpos agonistas CD137.

Ratones CD137L $-/-$ han puesto de relieve la importancia del sistema CD137/CD137L en las respuestas de las células T frente a tanto virus como tumores (M. DeBenedette y col., *J. Immunol.*, 163(9): 4833-41 (1999); J. Tan y col., *J. Immunol.*, 164(5): 2320-5 (2000); B. Kwon y col., *J. Immunol.*, 168(11): 5483-90 (2002)). Estudios que utilizan ratones deficientes en CD137 y CD137L han demostrado la importancia de la coestimulación de CD137 en la enfermedad del huésped contra injerto y en las respuestas citolíticas antivirales de las células T. Los ratones deficientes en CD137 tenían un aumento de la proliferación de células T, pero tenían una reducción de la producción de citoquinas y de la actividad citotóxica de las células T (B. Kwon y col., *J. Immunol.*, 168(11): 5483-90 (2002); D. Vinay y col., *Immunol. Cell Biol.*, 81(3): 176-84 (2003)). Más recientemente, se ha demostrado que los ratones knock-out (CD137 $-/-$) tenían una frecuencia más alta de metástasis tumorales (4 veces más) en comparación con los ratones control. Estos datos sugieren que la restauración de la señalización de CD137 mediante el uso de anticuerpos agonistas anti-CD137 es una estrategia factible para el aumento de las respuestas inmunes celulares a virus patógenos y cánceres.

Además de los datos en los modelos de ratón *in vivo* que apoyan la implicación de la señalización de CD137 en las respuestas inmunes antitumorales, los estudios llevados a cabo en las muestras de tumor humano primario han confirmado el papel de CD137 en la generación de células T efectoras. En los pacientes con sarcoma de Ewing, Zhang y col. demostraron que las células T efectoras intratumorales presentaban el fenotipo CD3/CD8+/CD28-/CD137+. Inesperadamente, se observó la coexistencia del crecimiento progresivo del tumor y la inmunidad antitumoral (células T efectoras). Los estudios de estimulación *ex vivo* con células de pacientes demostraron que la proliferación y activación de las células T inducida por tumor necesitaba la coestimulación con CD137L. La estimulación de PBL con anti-CD3/CD137L, pero sin anti-CD3/anti-CD28, inducía efectores líticos tumorales. Estos estudios proporcionaron pruebas adicionales de que la coestimulación mediada por CD137 podría dar lugar a la expansión de CTL reactivos tumorales (H. Zhang y col., *Cancer Biol. Ther.*, 2(5): 579-86 (2003)). Además se ha demostrado la expresión de CD137 en los linfocitos que infiltraban tumor en carcinomas hepatocelulares (HCC) (Y. Wan y col., *World J. Gastroenterol.*, 10(2): 195-9 (2004)). Se detectó la expresión de CD137 en 19 de 19 HCC por PCR-RT y en 13/19 por tinción inmunofluorescente. Por el contrario, CD137 no se detectó en las células mononucleares periféricas de los mismos pacientes. Los análisis que se llevaron a cabo en tejidos hepáticos de donantes sanos no demostraron expresión de CD137. Estos estudios no intentaban correlacionar la enfermedad clínica con la expresión de CD137. Por tanto, los estudios llevados a cabo en el sarcoma de Ewing y en el carcinoma hepatocelular revelaron la presencia de TIL que expresaban CD137, concomitante con la progresión de la enfermedad. En los sarcomas de Ewing se ha demostrado que TIL CD137+ eran capaces de destruir a las células tumorales *ex vivo* sugiriendo que la ruta de CD137 estaba intacta en estos pacientes y que quizá unos factores supresores en el microambiente tumoral inhibieron su función. Por consiguiente, puede postularse que la administración sistémica de anticuerpos agonistas CD137 puede proporcionar la señal necesaria para la expansión de estas células T efectoras.

Además de su papel en el desarrollo de la inmunidad frente al cáncer, los datos experimentales apoyan el uso de los anticuerpos agonistas CD137 en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y virales (B. Kwon y col., *Exp. Mol. Med.*, 35(1): 8-16 (2003); H. Salih y col., *J. Immunol.*, 167(7): 4059-66 (2001); E. Kwon y col., *P.N.A.S. EE.UU.*, 96: 15074-79 (1999); J. Foell y col., *N.Y. Acad. Sci.*, 987: 230.5 (2003); Y. Sun y col., *Nat. Med.*, 8(12): 1405-13 (2002); S. K. Seo y col., *Nat. Med.* 10; 1099-94 (2004)).

El documento WO9816249 desvela un procedimiento para aumentar la destrucción linfocítica de células tumorales en un huésped que comprende la administración al huésped de una dosis eficaz de un anticuerpo (Ab) anti-4-1BB (CD137). Para su administración a tumores, el Ab preferentemente es un Ab sustancialmente humano (véase, pág. 5, lín. 30-35). El mAAb 1D8 murino, generado mediante inmunización con 4-1BB murino, se ha informado que es único en unirse a la región proximal de la membrana del dominio extracelular de 4-1BB no implicado en la unión a 4-1BBL (véase, pág. 14, lín. 28-31)

El documento WO2004010947 proporciona un anticuerpo anti-4-1BB humano humanizado, es decir Hu39E3.G4, que no inhibe la unión de 4-1BB humano a un ligando 4-1BB humano. También proporciona un procedimiento para tratar el cáncer en un sujeto que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo a dicho sujeto.

LOO D. T. y col. (*The Journal of Biological Chemistry*; 7 Mar. 1997, 272 (10): 6448-6456) informan que la unión de 4-1BB al complejo 4-1BB.LN no desplaza la laminina (LN). Es decir, los dos ligandos se unen sitios proximales pero distintos sobre 4-1BB. 6/8 anticuerpos monoclonales anti-4-1BB bloquean la interacción entre 4-1BB y 4-1BBL,

mientras que 7 bloquean la unión a LN. Se ha demostrado que el anticuerpo 1 D8 bloquea la unión de LN pero no de 4-1BB murino y reconoce la proteína 4-1BB truncada sin capacidad de unión a 4-1BBL deficiente que carece del dominio LN-homólogo N-terminal (véase, resumen; pág. 6452).

5 En consecuencia, en base a los papeles de 4-1BB en la modulación de la respuesta inmune, sería deseable producir anticuerpos anti-4-1BB humano con actividades agonistas que pudieran utilizarse en el tratamiento o prevención de enfermedades humanas tales como cáncer, enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunes.

Breve resumen de la invención

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones.

10 La presente invención proporciona anticuerpos enteramente humanos que se unen a 4-1BB humano (H4-1BB) y que permiten la unión de H4-1BB a un ligando 4-1BB humano (H4-1BBL). Por tanto, la invención se refiere a anticuerpos que se unen a H4-1BB y que no bloquean la unión de H4-1BB a H4-1BBL., permitiendo de esta manera la unión de un anticuerpo de la invención y H4-1BBL a H4-1BB. La invención también proporciona anticuerpos con actividades agonistas en los que la unión de los anticuerpos a H4-1BB da como resultado el aumento y la estimulación de las respuestas inmunes mediadas por H4-1BB. Estos anticuerpos se pueden utilizar como potenciadores inmunitarios de una respuesta antitumoral o antiviral o como inmunomoduladores de las enfermedades autoinmunes mediadas por células T. Los anticuerpos pueden también utilizarse como herramientas de diagnóstico para la detección de H4-1BB en la sangre o tejidos de pacientes con cáncer, enfermedad autoinmune u otras enfermedades.

20 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal enteramente humano o una parte de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a H4-1BB, que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, en el que la región variable de cadena ligera comprende una CDR1 (región determinante de complementariedad 1), una CDR2 (región determinante de complementariedad 2) y una CDR3 (región determinante de complementariedad 3) como se representa en la FIG. 4 y la región variable de cadena pesada comprende una CDR1 (región determinante de complementariedad 1), una CDR2 (región determinante de complementariedad 2) y una CDR3 (región determinante de complementariedad 3) como se representa en la FIG. 2 o la FIG. 7. El anticuerpo monoclonal (mab) puede ser, por ejemplo, un anticuerpo de IgG4 o un anticuerpo de IgG1.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal enteramente humano o una parte de unión a antígeno del mismo, en el que la cadena ligera comprende una región variable como se representa en la FIG.4 y la cadena pesada comprende una región variable como se representa en la FIG. 3 o la FIG. 7.

30 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal enteramente humano que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende los restos aminoacídicos 21-236 de SEC ID N°: 6 y la cadena pesada comprende los restos aminoacídicos 20-467 de SEC ID N°: 3. En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal enteramente humano que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende los restos aminoacídicos 21-236 de SEC ID N°: 6 y la cadena pesada comprende los restos aminoacídicos 20-470 de SEC ID N°: 9.

35 Los anticuerpos de la invención tienen amplias aplicaciones terapéuticas como inmunomoduladores de enfermedades tales como el cáncer, las enfermedades autoinmunes, las enfermedades inflamatorias y las enfermedades infecciosas.

40 La invención proporciona además un anticuerpo o una parte de anticuerpo de unión a antígeno de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer de un sujeto que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo o parte de anticuerpo de unión a antígeno al sujeto. En un aspecto, este uso además comprende la administración de una vacuna. Vacunas adecuadas incluyen, por ejemplo, una vacuna de células tumorales, una vacuna de ADN, una vacuna de células tumorales modificada por GM-CSF o una vacuna de células dendríticas cargada de antígeno. El cáncer puede ser, por ejemplo, cáncer de próstata, melanoma o cáncer epitelial.

45 Además, se desvelan en el presente documento, un procedimiento para aumentar la respuesta inmune, que comprende la administración de un anticuerpo de la invención y una vacuna gag SIV; un procedimiento para aumentar la respuesta inmune, que comprende la administración de un anticuerpo de la invención y una vacuna PSA; un procedimiento para aumentar la respuesta inmune a una vacuna gag SIV, que comprende la administración de un anticuerpo de la invención; y un procedimiento para aumentar la respuesta inmune a una vacuna PSA, que comprende la administración de un anticuerpo de la invención.

50 La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo de la invención o una parte de unión a antígeno del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica se puede administrar sola o en combinación con un agente, por ejemplo, un agente para tratar el cáncer tal como un agente quimioterapéutico o una vacuna u otro agente inmunomodulador.

55 Además, se desvelan en el presente documento, polinucleótidos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada entre: (a) los nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de los restos aminoacídicos 20-467 de SEC ID N°: 3; (b) los nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°:

3; (c) los nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de los restos aminoácidos 21-236 de SEC ID N°: 6; (d) los nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6; (e) los nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de los restos aminoácidos 20-470 de SEC ID N°: 9; (f) los nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 9; y (g) los nucleótidos que codifican un fragmento de una secuencia de aminoácidos de (a) a (f), tal como una región variable, una región constante o una o más CDR. Los polinucleótidos desvelados en el presente documento además comprenden secuencias de nucleótidos que codifican al menos una CDR de la FIG. 3, al menos una CDR de la FIG. 4 o al menos una CDR de la FIG. 7. Además, se desvelan en el presente documento, los polinucleótidos aislados que comprenden las secuencias de nucleótidos de SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 4 o SEC ID N°: 7.

Adicionalmente, se desvelan en el presente documento, los polipéptidos aislados que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 6 y SEC ID N°: 9; los polipéptidos aislados que comprenden la secuencia de aminoácidos de los restos aminoácidos 20-467 de SEC ID N°: 3, los polipéptidos aislados que comprenden la secuencia de aminoácidos de los restos aminoácidos 21-236 de SEC ID N°: 6 y los polipéptidos aislados que comprenden la secuencia de aminoácidos de los restos aminoácidos 20-470 de SEC ID N°: 9; así como los polipéptidos aislados que comprenden la secuencia de aminoácidos de al menos una CDR de la FIG. 3, la FIG. 4 o la FIG.7 o al menos la región variable o constante de la FIG. 3, la FIG. 4 o la FIG. 7.

Además, se desvela en el presente documento, una inmunoglobulina que tiene especificidad de unión por H4-1BB, dicha inmunoglobulina comprendiendo una región de unión a antígeno. En un aspecto, la inmunoglobulina es un Fab o F(ab')₂ de un anticuerpo de la invención.

Además, se desvelan en el presente documento una línea celular que produce un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo de la invención, vectores de expresión recombinantes que incluyen los nucleótidos de la invención y procedimientos para preparar los anticuerpos de la invención cultivando una línea celular productora de anticuerpos.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra un mapa plasmídico de pD17-20H4.9.h4a.

La FIG. 2 muestra un mapa plasmídico de pD16gate-20H4.9.L.C.

La FIG. 3 (FIG. 3A-3H) muestra la secuencia de nucleótidos del plásmido pD17-20H4.9.h4a, incluyendo la cadena codificante (SEC ID N°: 1), la cadena complementaria (SEC ID N°: 2) y la secuencia de aminoácidos (el péptido líder es los restos aminoácidos 1-19 de SEC ID N°: 3; la cadena pesada es los restos aminoácidos 20-467 de SEC ID N°: 3) codificadas por la cadena codificante.

La FIG.4 (FIG. 4A-4F) muestra la secuencia de nucleótidos del plásmido pD16gate-20H4.9.L.C, incluyendo la cadena codificante (SEC ID N°: 4), la cadena complementaria (SEC ID N°: 5) y la secuencia de aminoácidos (el péptido líder es los restos aminoácidos 1-20 de SEC ID N°: 6; la cadena ligera es los restos aminoácidos 21-236 de SEC ID N°: 6) codificados por la cadena codificante.

La FIG. 5 muestra un esquema de la construcción de la secuencia de cadena pesada de 20H4.9-IgG1.

La FIG. 6 muestra un esquema de la construcción de cadena ligera del 20H4.9

La FIG. 7 (FIG. 7A-7D) muestra las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la construcción de cadena pesada de 20H4.9-IgG 1, incluyendo la cadena codificante (SEC ID N°: 7), la cadena complementaria (SEC ID N°: 8) y la secuencia de aminoácidos (péptido líder es los restos aminoácidos 1-19 de SEC ID N°: 9; la cadena pesada es los restos aminoácidos 20-470 de SEC ID N°: 9) codificados por la cadena codificante.

La FIG. 8 (FIG. 8A-8B) ilustra los resultados obtenidos de la unión del mab 20H4.9-IgG1 a CD137 humano por ELISA (FIG. 8A) y el efecto del mab 20H4.9-IgG1 sobre la interacción CD137/CD137L (FIG. 8B).

La FIG. 9 (FIG. 9A-9B) ilustra los resultados obtenidos de la unión del mab 20H4.9-IgG1 a las células humanas o de mono cinomolgus estimuladas con PMA-ionomicina. Las CEM humanas (FIG. 9A) o las PBMC de mono (FIG. 9B) se incubaron con 20H4.9-IgG1 o la proteína de fusión humana CD137L.

La FIG. 10 (FIG. 10A-10B) ilustra los resultados obtenidos mediante la inducción de IFN- γ en los estudios de coestimulación con anticuerpos anti-CD137, que se expresan como el aumento en veces en pg/ml con respecto a los controles. Debido a la respuesta de fondo variable entre los donantes, los datos se normalizaron en relación a los tratamientos de control (=1). El nivel medio de línea basal de IFN- γ para las células T humanas (FIG. 10A) o PBMC de mono (FIG. 10B) estimuladas con anti-CD3 solo, fue 592 pg/ml y 505 pg/ml respectivamente.

La FIG. 11 proporciona representaciones de resonancia de plasmón de unión de mab 20H4.9-IgG4 y mab 20H4.9-IgG1 a CD137 humano.

La FIG. 12 ilustra la unión dependiente de la concentración de 20H4.9-IgG4 a las células CEM humanas estimuladas por PMA ionomicina, pero no la unión de las células CEM no estimuladas.

La FIG. 13 (FIG. 13A-B) ilustra la inducción de IFN- γ en estudios de coestimulación con anticuerpos anti-CD137. Los resultados se expresan como el aumento en veces en pg/ml con respecto a los controles. Debido a la respuesta de fondo variable entre los donantes, los datos se normalizaron con relación a los tratamientos de control (=1). El nivel medio de línea basal de IFN- γ para las células T humanas (FIG. 13A) o las PBMC de mono (FIG. 13B) estimuladas con anti-CD3 solo fue 592 pg/ml y 505 pg/ml respectivamente.

La FIG. 14 (FIG. 14A-14B) ilustra los resultados obtenidos del aumento dependiente de la dosis de la síntesis de IFN- γ por el mab 20H4.9-IgG4 (FIG.14A) y el efecto del entrecruzamiento de anticuerpos mediante la adición de anticuerpos anti-IgG humana de entrecruzamiento (7 μ g/ml) (FIG. 14B).

La FIG. 15 ilustra el efecto de mab 20H4.9-IgG4 sobre la supervivencia de las células T y la progresión del ciclo celular. Las células T humanas se coestimularon con anti-CD3 (1 μ g/ml) \pm mab 20H4.9-IgG4 a las concentraciones que se enumeran. Seis días después del inicio de los ensayos, las células se recogieron y se tiñeron con Anexina-V y yoduro de propidio para determinar el número de células vivas (Anexina V/PI negativa) o con ciclina D2 conjugada con PE para detectar las células en ciclo. Los resultados representan la media (\pm DT) de 4 lotes de mab 20H4.9-IgG4 ensayados en paralelo.

La FIG. 16 (FIG. 16A-16D) muestra la respuesta de IFN- γ específica de antígeno en monos cinomolgus medida con ELISPOT después del tratamiento con vacuna de ADN \pm anticuerpos anti-4-1BB humanos. Los animales se trataron con una vacuna gag SIV (día 0, 28, 56; FIG. 16A), vacuna gag SIV (día 0, 28, 56) y mab 20H4.9-IgG4 (día 12, 15 y 19; FIG. 16B) o vacuna gag SIV (día 0, 28, 56) y hu39E3.G4 (día 12, 15 y 19; FIG 16C). Un grupo de animales se dejó sin tratar (FIG. 16D). En diversos momentos después del tratamiento, se recogió sangre y se separaron las PBMC y se evaluaron en cuanto a su capacidad para secretar IFN- γ en presencia de estimulación antigénica.

Descripción detallada de la invención

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones.

La invención está dirigida a la preparación y caracterización de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos (incluyendo las proteínas de fusión que comprenden un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención), para su uso en el tratamiento de una enfermedad, tal como un cáncer, una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmune. El cáncer puede ser, por ejemplo, cáncer de próstata, melanoma o cáncer epitelial.

Los anticuerpos son capaces de unirse a H4-1BB y pueden presentar una alta afinidad por H4-1BB y potenciar de forma eficaz las respuestas de las células T. En un aspecto, el anticuerpo induce la producción de IFN- γ en los ensayos de coestimulación, pero no afecta la unión de H4-1BB a su ligando correspondiente, H4-1BBL y no fija el complemento.

Los anticuerpos de la invención pueden producirse por procedimientos bien conocidos en la técnica. En un aspecto, los anticuerpos se pueden producir por expresión en células transfectadas, tales como células eucariotas inmortalizadas, tales como células de mieloma o hibridoma.

Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar solos o junto con otros agentes terapéuticos tales como radioterapia (incluyendo radiación), terapia hormonal, agentes citotóxicos, vacunas y otros agentes inmunomoduladores, tales como citoquinas y modificadores de respuesta biológica. Estos agentes son particularmente útiles en el tratamiento del cáncer y trastornos inmunoproliferativos.

La invención proporciona el anticuerpo monoclonal (mab) 20H4.9-IgG4. Las FIG. 1 y 2 proporcionan los mapas plasmídicos de pD17-20H4.9h4a y pD16gate-20H4.9.LC, respectivamente, que se pueden utilizar para producir el mab 20H4.9-IgG4. La FIG. 3 (FIG 3A-3H) proporciona la secuencia de nucleótidos del plásmido pD17-20H4.9h4a, incluyendo la cadena codificante (SEC ID N°: 1), la cadena complementaria (SEC ID N°: 2) y la secuencia de aminoácidos (el péptido líder está formado por los restos aminoácídicos 1-19 de SEC ID N°: 3; la cadena pesada está formada por los restos aminoácídicos 20-467 de SEC ID N°: 3) codificada por la cadena codificante. La FIG. 4 (FIG. 4A-4F) muestra la secuencia de nucleótidos del plásmido pD16gate-20H4.9.LC, incluyendo la cadena codificante (SEC ID N°: 4), la cadena complementaria (SEC ID N°: 5), la secuencia de aminoácidos (el péptido líder está formado por los restos aminoácídicos 1-20 de SEC ID N°: 6; la cadena ligera está formada por los restos aminoácídicos 21-236 de SEC ID N°: 6) codificada por la cadena codificante.

En otro aspecto, la invención proporciona el anticuerpo monoclonal (mab) 20H4.9-IgG1. La FIG. 5 muestra esquemáticamente una construcción de la secuencia de la cadena pesada del mab 20H4.9-IgG1. La FIG. 6 muestra esquemáticamente una construcción de la secuencia de la cadena ligera del mab 20H4.9-IgG1 y 20H4.9-IgG4. La FIG. 7 proporciona la secuencia de nucleótidos (cadena codificante (SEC ID N°: 7) y cadena complementaria (SEC ID N°: 8)) de la construcción de la secuencia de la cadena pesada de la FIG. 5 y la secuencia de aminoácidos (el péptido líder está formado por los restos aminoácídicos 1-19 de SEC ID N°: 9; la cadena pesada está formada por los restos aminoácídicos 20-470 de SEC ID N°: 9) codificada por la cadena codificante. La cadena ligera del mab 20H4.9-IgG1 es la misma que la cadena ligera del mab 20H4.9-IgG4.

La invención también engloba anticuerpos con sustituciones de aminoácidos conservativas de las secuencias de las cadenas pesada y ligera representadas en las SEC ID N°: 3, 6 y 9 que no tienen sustancialmente ningún efecto sobre la unión de H4-1BB. Las sustituciones conservativas incluyen típicamente la sustitución de un aminoácido por otro con características similares, por ejemplo, sustituciones dentro de los siguientes grupos: valina, glicina; glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina.

Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la invención comprenden además típicamente una secuencia de control de expresión que está unida operativamente a las secuencias codificantes de polipéptidos, incluyendo las regiones promotoras asociadas naturalmente o heterólogas. Preferentemente, las secuencias de control de expresión serán sistemas promotores eucariotas en vectores capaces de transformar o transfectar células huésped eucariotas, pero también se pueden utilizar las secuencias de control para huéspedes procariotas. Una vez que el vector se ha incorporado en un huésped apropiado, el huésped se mantiene en condiciones adecuadas para un alto nivel de expresión de las secuencias de nucleótidos y, según se desee, se puede continuar con la recolección y purificación de la cadena ligera, la cadena pesada, los dímeros de cadena ligera/pesada o el anticuerpo intacto, fragmentos de unión y otras formas de inmunoglobulinas. (Véase, S. Beychok, *Cells of Immunoglobulin Synthesis*, Academic Press, N.Y. (1979)). También se pueden producir anticuerpos de cadena única o minicuerpos (anticuerpos de cadena única fusionados a uno o más dominios CH) uniendo las secuencias de ácido nucleico que codifican las regiones VL y VH desveladas en el presente documento con el ADN que codifica un engarce polipeptídico.

Se pueden utilizar los huéspedes procariotas, tales como *E. coli* y otros microbios, tales como levaduras, para expresar un anticuerpo de la invención. Se pueden utilizar, además de los microorganismos, los cultivos celulares de tejidos de mamíferos, para expresar y producir los anticuerpos de la invención. Pueden preferirse las células eucariotas, debido a que se han desarrollado varias líneas de células huésped capaces de segregar inmunoglobulinas intactas, incluyendo, por ejemplo, las líneas de células CHO (de ovario de hámster chino), líneas de células COS (línea de células de fibroblastos de mono verde africano), células HeLa, líneas de células de mieloma, e hibridomas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir las secuencias de control de expresión, tales como un promotor o potenciador y sitios de procesamiento de la información necesarios, tales como los sitios de unión a ribosomas, sitios de empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias de terminación transcripcional, todas ellas bien conocidas en la técnica.

Los vectores que contienen los segmentos de ADN de interés (por ejemplo, las secuencias codificantes de la cadena pesada y/o ligera y las secuencias de control de expresión) se pueden transferir a la célula huésped por procedimientos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de huésped celular. Por ejemplo la transfección en cloruro cálcico, se utiliza comúnmente en células procariotas, mientras que se puede utilizar el tratamiento con fosfato cálcico, lipofección o electroporación en otros huéspedes celulares (Véase por ejemplo, T. Maniatis y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1982)).

Una vez expresados, los anticuerpos, sus dímeros, las cadenas individuales pesada y ligera y otras formas de inmunoglobulina se pueden purificar de acuerdo con los procedimientos de referencia en la técnica, tales como precipitación con sulfato amónico, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares. Son deseables las inmunoglobulinas sustancialmente puras de al menos el 90 al 95% de homogeneidad y son más deseables el 98 al 99% o más de homogeneidad.

Los anticuerpos de la invención son útiles para modular las respuestas inmunes de las células T y mediadas por anticuerpos. Las patologías típicas adecuadas para el tratamiento incluyen cánceres, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes tales como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y miastenia grave.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas se pueden esterilizar por técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como los agentes de ajuste de pH y de tamponamiento, agentes que aumentan la estabilidad tales como manitol o Tween 80, agentes que ajustan la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, lactato sódico o albúmina humana.

Los anticuerpos y las composiciones farmacéuticas de la invención son particularmente útiles para administración parenteral, incluyendo la administración subcutánea, intramuscular e intravenosa. Las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral pueden comprender una solución del anticuerpo disuelto en un vehículo aceptable, preferentemente un vehículo acuoso. Se puede utilizar una diversidad de vehículos acuosos, todos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina, glicina y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente libres de materia particulada. Es especialmente provechoso formular las composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación.

La composición farmacéutica puede además comprender un agente adicional para el tratamiento de una enfermedad. En un aspecto, la composición farmacéutica incluye un agente para el tratamiento del cáncer, una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad autoinmune. El anticuerpo de la invención también puede administrarse en conjunto o administrarse por separado de un agente adicional para el tratamiento de una enfermedad.

Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar con otros agentes para mejorar la respuesta inmune frente a las células cancerosas en un paciente. En un aspecto, el anticuerpo se utiliza en combinación con un agente inmunogénico, tal como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (incluyendo proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidratos) o células transfectadas con genes que codifican citoquinas inmunoestimulantes y antígenos de superficie celular. En otro aspecto, el anticuerpo se utiliza en combinación con una vacuna, tal como, por ejemplo una vacuna de células tumorales, una vacuna de ADN, una vacuna de células tumorales modificada genéticamente, tal como una vacuna de células tumorales modificadas por GM-CSF, una vacuna peptídica o una vacuna de células dendríticas cargadas con antígeno.

Se han ideado muchas estrategias experimentales para la vacunación contra tumores. En una de estas estrategias, se prepara una vacuna utilizando células tumorales autólogas o alogénicas. Estas vacunas celulares han demostrado ser las más eficaces cuando las células tumorales se transducen para expresar GM-CSF. El GM-CSF ha demostrado ser un activador potente de la presentación antigénica para la vacunación tumoral (Dranoff y col., P.N.A.S., 90: 3539-4.3 (1993); E. Jafee y col., J. Clin. Oncol., 19: 145-56 (2001); R. Salgia y col., J. Clin. Oncol., 21: 624-30 (2003)).

El estudio de la expresión génica y los patrones de expresión génica a gran escala en diversos tumores ha llevado a la definición de los llamados antígenos específicos de tumor (S. Rosenberg, Immunity 10: 281-7 (1999)). En muchos casos, estos antígenos específicos de tumor son antígenos de diferenciación expresados en los tumores y en la célula a partir de la cual surgió el tumor, por ejemplo, los antígenos melanocíticos gp 100, antígenos MAGE, Trp-2. Se ha podido demostrar que muchos de estos antígenos son las dianas de las células T específicas de tumor que se encuentran en el huésped. Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar junto con una colección de proteínas y/o péptidos recombinantes expresados en un tumor con el fin de amplificar y dirigir la respuesta inmune a estos antígenos hacia una respuesta Th1. Esas proteínas normalmente son vistas por el sistema inmune como autoantígenos y por tanto los toleran.

En un aspecto, el anticuerpo de la invención se combina con un agente inmunomodulador que comprende el antígeno gag SIV (como un modelo para la vacuna de ADN del VIH) o el antígeno específico de próstata (PSA) o una vacuna de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el antígeno gag SIV o el antígeno específico de próstata (PSA). Las vacunas de PSA se describen en, por ejemplo, M. Pavlenko y col., Br. J. Cancer, 91(4): 688-94 (2004); J. Wolchok y col., Semin. Oncol., 30(5): 659-66 (2003); J. Kim y col., Clin. Cancer Res., 7(3 Suppl.): 882s-889s (2001). Las vacunas gag SIV se describen en, por ejemplo, B. Makitalo y col., J. Gen. Virol., 85(Pt 8): 2407-19 (2004); N. Letvin y col., J. Virol., 78(14): 7490-7 (2004); S. Mossman y col., AIDS Res. Hum. Retroviruses., 20(4): 425-34 (2004); F. Bertley y col., J. Immunol., 172(6): 3745-57 (2004); L. Patterson y col., J. Virol., 78(5):2212-21 (2004); E. O'Neill y col., AIDS Res. Hum. Retroviruses, 19(10): 883-90 (2003); Z. Bu y col., Virology, 309(2): 272-81 (2003).

El antígeno tumoral también puede incluir, por ejemplo, la proteína telomerasa, que se necesita para la síntesis de los telómeros de los cromosomas y que se expresa en más del 85% de los cánceres humanos y solamente en un número limitado de tejidos somáticos (N. Kim y col., Science, 266, 2011-2013 (1994)). El antígeno tumoral puede ser también "neo-antígenos" expresados en las células cancerosas debido a mutaciones somáticas que alteran la secuencia de proteínas o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no relacionadas o el idiotopo de los tumores de células B. Otras vacunas tumorales pueden incluir las proteínas de los virus implicados en los cánceres humanos tales como los Virus del Papiloma Humano (VPH), Virus de la Hepatitis (VHB y VHC) y el Herpes Virus del Sarcoma de Kaposi (HVSK). Otra forma de antígeno tumoral específico que se puede utilizar con un anticuerpo de la invención son las proteínas de choque térmico purificadas (HSP) aisladas a partir del propio tejido tumoral. Estas proteínas de choque térmico contienen fragmentos de proteínas de las células tumorales y estas HSP son altamente eficaces en el suministro a las células presentadoras de antígeno para inducir inmunidad tumoral (R. Suot y col., Science 269: 1585-1588 (1995); Y. Tamura y col., Science 278: 117-120 (1997)).

Los anticuerpos de la invención se pueden utilizar también para aumentar la respuesta inmune a las vacunas frente a antígenos virales, tales como VIH o VHC. Los anticuerpos de la invención también se pueden utilizar para aumentar la respuesta inmune a otros agentes inmunomoduladores y para provocar una respuesta inmune de memoria. Los ejemplos de estos agentes son las citoquinas tales como GM-CSF, IL-2, IL-15, IL-12, ligando F-13, ligando CD40, adyuvantes tales como el oligodesoxinucleótido CpG (ADN bacteriano) o anticuerpos frente a OX-40 o CTLA-4.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En la aplicación terapéutica, la composición farmacéutica se administra a un paciente que ya padece una enfermedad, en una cantidad suficiente para curar o detener o tratar al menos parcialmente la enfermedad. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la patología y del paciente (incluyendo, por ejemplo, el estado general del sistema inmune del propio paciente) y puede determinarla un experto en la técnica. En las aplicaciones profilácticas, la composición farmacéutica se administra a un paciente todavía no tiene la patología, para aumentar la resistencia del paciente a la patología. Tal cantidad se define como que es una "dosis profilácticamente eficaz". En este uso, las cantidades precisas dependen del estado de salud del paciente (incluyendo, por ejemplo, el estado general del sistema inmune del propio paciente) y puede determinarla un experto en la técnica. En un aspecto, el

uso profiláctico es para la prevención de la reaparición tumoral.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de Anticuerpos

Materiales y Procedimientos

5 Los anticuerpos monoclonales enteramente humanos frente al receptor CD137 humano (4-1BB) se generaron en el HuMAb-Mouse® (Medarex, Inc., Princeton, Nueva Jersey). Los ratones HuMAb se inmunizaron cinco veces por vía intraperitoneal (i.p.) y por vía subcutánea (s.c.) con 25 µg del dominio extracelular de CD137 humano en adyuvante RIBI (Ribi Immunochemical). Antes de la fusión, los ratones se reforzaron por vía intravenosa (i.v.) con la misma cantidad de antígeno. Las células del bazo de los ratones inmunizados con títulos adecuados de anticuerpos frente a huCD137 se fusionaron con células de mieloma de ratón siguiendo los procedimientos convencionales.

10 El mab anti-CD3 humano (clon: HIT3a), los kits de ELISA para IFN-γ humano y de mono, los kits de matriz de perlas citométricas (CBA) y todos los anticuerpos conjugados para la citometría de flujo se adquirieron en BD Pharmigen (San Diego, California). La IgG₁λ humana y la IgG₁κ humana se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri). Las células CEM (ATCC-CRL 2265) se adquirieron en la ATCC. Los medios de cultivo (RPMI) y el suero bovino fetal (FBS) se adquirieron en Mediatech Inc. (Herndon, Virginia). Los glóbulos rojos de oveja Alsevers se adquirieron en Colorado Serum Co. (Denver, Colorado).

15 Exploración de hibridoma: Detección de unión a huCD137 por ELISA: Para identificar los hibridomas que secretan anticuerpos anti-CD137 humanos, las placas de ELISA (Nunc MaxiSorp) se revistieron con proteína de fusión CD137 humano-IgG_{2b} de ratón a 1 µg/ml en PBS durante una noche a 4 °C. Las placas se lavaron posteriormente 3 veces con PBS con Tween-80 al 0,01% (PBS-T) y posteriormente se bloquearon con PBS-T más albúmina sérica bovina al 1% (BSA), durante 20 min a temperatura ambiente. Se añadieron a las placas cincuenta microlitros de los sobrenadantes diluidos 1:3 en PBS-T y se incubaron durante 1-2 h a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron las placas como anteriormente y se detectó la unión de los anticuerpos por incubación con anticuerpo anti-IgG humana de F(ab')₂ de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson Laboratories, West Grove, Pennsylvania). Las placas se desarrollaron con pNPP y se leyeron a 405 nm.

20 Ensayo de bloqueo: Se evaluaron veintiséis hibridomas que secretaban anticuerpos que reconocían huCD137 por ELISA para determinar su capacidad de permitir las interacciones CD137-CD137L. Estos análisis se llevaron a cabo inicialmente en un formato de ELISA. Las placas se revistieron con 100 µl/pocillo de CD137 humano-mulG_{2b} a 0,2 µg/ml. Se añadieron a la placa diluciones en serie de 20H4.9-IgG1 o anticuerpos de control, diluidos en PBS-T y albúmina sérica bovina al 1%. Se añadió la proteína de fusión CD137L-CD8 a los pocillos a una concentración de 0,2 µg/ml. Se detectaron los anticuerpos unidos con un anticuerpo anti-CD8 biotinilado (0,2 µg/ml, Ancell Corporation, Bayport, Minnesota). Después de varios lavados, se añadieron estreptavidina-fosfatasa alcalina (1:2000) y pNPP para la detección de los anticuerpos unidos y las placas se leyeron a 405 nm.

25 Para confirmar que los anticuerpos seleccionados no alteraron la unión CD137-CD137L, los anticuerpos purificados se caracterizaron además con análisis BIAcore. Todos los experimentos se llevaron a cabo con un instrumento BIAcore 3000 (BIAcore Inc., Piscataway, Nueva Jersey). CD137 humano se inmovilizó covalentemente a alta densidad sobre una superficie de dextrano carboximetilado de una microplaca sensora BIAcore (BIAcore Inc., Piscataway, Nueva Jersey). Las inyecciones se llevaron a cabo a 2 µg/ml en tampón de acetato 10 mM, a pH 5,0. Los ésteres activos sin ocupar se bloquearon posteriormente por inyección de un exceso de etanolamina. La regeneración de la superficie se realizó con glicina 10 mM, pH 2,0.

30 Las muestras purificadas de los anticuerpos anti-CD137 se diluyeron a concentraciones entre 200 y 1000 nM utilizando solución salina tamponada con HEPES, a pH 7,4, complementado con NaCl 0,15 mM y surfactante P20 (HBS-EP) al 0,005%. Las proteínas de fusión humanas CD137L-CD8 (huCD137L) se utilizaron como una fuente de ligando CD137. Los experimentos se llevaron a cabo de forma que el huCD137L se inyectó antes que los anticuerpos anti-CD137 o viceversa. Las inyecciones se llevaron a cabo a un caudal de 5 µl/min. Los ligandos y anticuerpos unidos se eliminaron por regeneración con tampón de glicina 10 mM, pH 2,0.

35 Purificación de células T humanas: Las células T o las PBMC se obtuvieron de donantes humanos sanos. La sangre se recolectó en EDTA, se suspendió en tampón de separación por elución (RPMI que contiene EDTA 2,5 mM y polimixina B a 10 µg/ml), con una capa inferior de Medio de Separación de Linfocitos (LSM, Mediatech Inc., Herndon, Virginia) y se centrifugó a 1800 rpm durante 25 minutos. Se recogieron las interfaces celulares y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón de separación por elución y se lavaron en Glóbulos Rojos de Oveja (SRBC, a una dilución de 1:10) y se incubaron en hielo durante 1 hora. Posteriormente se colocó una capa de LSM por debajo de las células y se centrifugaron a 2500 rpm durante 25 minutos. Las interfaces se eliminaron y los SRBC se lisaron con Tampón de Lisis de SRBC. Las células T aisladas se lavaron y se resuspendieron en FBS/RPMI al 10%.

Análisis de Citometría de Flujo: La unión de los anticuerpos anti-CD137 humano a CD137 expresado en las células se determinó por citometría de flujo. Se utilizó para estos estudios una línea celular de células T de leucemia humanas (CEM) o células monocíticas de sangre periférica de monos cinomolgus (PBMC). Estas células no expresan CD137 de manera constitutiva, pero el receptor puede inducirse por estimulación con forbol miristato (PMA, a 10 ng/ml) e ionomicina (1 μ M) durante 18 h. Las células se lavaron posteriormente y se incubaron con diversas concentraciones de los anticuerpos en tampón de tinción (solución salina tamponada con fosfato, PBS, más FBS al 1% y azida sódica al 0,01%). La unión de los anticuerpos a las células estimuladas o no estimuladas se detectó por un anti-IgG humana de cabra conjugado con fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania). Para confirmar la expresión de CD137, se utilizó una proteína que consistía en el dominio extracelular del ligando CD137 y CD8 de ratón (Ancel Corporation, Bayport, Minnesota) seguido por incubación con anti-CD8 de ratón conjugado con PE (BD Pharmingen, San Diego, California). Se fijaron las muestras en formalina al 1%, se mantuvieron a 4 °C y se leyeron por citometría de flujo.

Ensayos Funcionales: Células T humanas primarias o PMBC de mono obtenidas de donantes sanos se estimularon con anticuerpos inmovilizados anti-CD3 para proporcionar la primera señal de activación a las células T y se coestimularon con anticuerpos humanos anti-CD137 humano. Como control no específico se utilizó un anticuerpo anti-carcinoma humanizado (BR96) a la misma concentración de anticuerpo. Las placas se revistieron con anticuerpo anti-CD3 (0,5-1 μ g/ml) a 4 °C durante una noche. Al día siguiente las células T o las PBMC se sembraron en placas a concentraciones de 1-1,5 x 10⁵/pocillo. Se midió la síntesis de IFN- γ después de 72 horas de cultivo a 37 °C por matriz de perlas citométricas (CBA) o por ELISA.

Ensayos de citoquina

ELISA: Tras la estimulación de las células T en diversos momentos, las placas se centrifugaron y el medio se eliminó. Los niveles de citoquina se detectaron por un ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Pharmingen, San Diego, California). En resumen, las muestras de ensayo y los patrones se añadieron a unas placas de 96 pocillos revestidas con anti-citoquina. Después de incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, las placas se lavaron 3 veces en PBS-T y luego se incubaron primero con un anticuerpo detector de trabajo, seguido por adición de sustrato. Se leyó la absorbancia a 405 nm y se calcularon las concentraciones en base a la curva estándar.

Matriz de Perlas Citométricas: Otro procedimiento que se utilizó para determinar la producción de citoquinas *in vitro* fue la citometría de flujo utilizando la matriz de Perlas Citométricas (CBA) desarrollado por BD Pharmingen. Se midieron los niveles de IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-4, IL-10 y TNF- α en los sobrenadantes de cultivo siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se analizaron mediante citometría de flujo con el software de análisis de CBA.

Resultados

Los hibridomas que secretaban anticuerpos que mostraban unión con CD137 humano se expandieron adicionalmente y se subclonaron. Los anticuerpos secretados se purificaron y se ensayó su capacidad para unirse a huCD137 y para permitir la interacción entre CD137-CD137L. Del panel de anticuerpos anti-CD137 humano evaluados, el mab 20H4.9-IgG1 se seleccionó para evaluación adicional basándose en su perfil de unión y sus propiedades no bloqueantes. El anticuerpo 20H4.9-IgG1 es una IgG1 kappa como se determinó por ELISA utilizando fosfatasa alcalina anti-IgG1, 2, 3, 4 humana y reactivos anti-kappa y lambda (Southern Biotech, Birmingham, Alabama). La FIG.8 (FIG. 8A – unión al CD137 humano mediante ELISA; FIG. 8B – efecto del mab 20H4.9-IgG1 sobre la interacción CD137-CD137L) proporciona la caracterización inicial del mab 20H4.9-IgG1. Se evaluaron las diluciones en serie del mab 20H4.9-IgG1, 26G6 (un anticuerpo bloqueante anti-CD137) o toxoide tetánico (TT, control negativo) en cuanto a su capacidad para alterar la unión de CD137 al CD137L. El mab 20H4.9-IgG1 a concentraciones de hasta 10 μ g/ml no bloqueaba la unión al CD137L, mientras que el mab 26G6 inhibió la unión a concentraciones >0,37 μ g/ml.

El mab 20H4.9-IgG1 también se ensayó en cuanto a la reactividad hacia CD137 expresado en las células T humanas (CEM) y en las células monocíticas en sangre periférica del mono cinomolgus (PBMC) estimuladas con PMA e ionomicina. Los estudios previos determinaron que CD137 está regulado positivamente en las células T después de la activación con PMA e ionomicina. Las moléculas de control consistían en un anticuerpo IgG humano irrelevante (control negativo) o proteína de fusión CD137-CD8 (control positivo, BD Pharmingen, San Diego, California). Los resultados de estos estudios indicaron que el mab 20H4.9-IgG1 se unió a CEM humanas y PBMC de monos cinomolgus activadas, con una unión mínima a las células no estimuladas. Porcentajes similares de células positivas se detectaron con mab 20H4.9-IgG1 o con CD137L. La FIG. 9 proporciona los resultados obtenidos que demuestran la unión de mab 20H4.9-IgG1 a las células humanas estimuladas con PMA-ionomicina o células de mono cinomolgus. Las CEM humanas (FIG. 9A) o las PBMC de mono (FIG. 9B) se incubaron con proteína de fusión 20H4.9-IgG1 o CD137L humana. Se añadieron anticuerpos secundarios y las muestras se leyeron por citometría de flujo.

A continuación, se determinó si el mab 20H4.9-IgG1 podía inducir el aumento de IFN- γ en ensayos coestimuladores en presencia de estimulación anti-CD3, el efecto clave deseado para un anticuerpo agonista CD137. Se evaluó el

mab 20H4.9-IgG1 con respecto a su actividad coestimuladora en estudios funcionales en linfocitos humanos y de mono. Basándose en los datos iniciales, se utilizó una concentración de anticuerpo anti-CD137 de 20 µg/ml (exceso de anticuerpo) en estos estudios. Se ensayaron los niveles de anticuerpo anti-CD3 entre 0,2-1 µg/ml los cuales dieron como resultado que el 10-20% de los linfocitos eran positivos a CD137. Se midieron los niveles de IFN-γ en los sobrenadantes después de 72 h de cultivo. Como se muestra en la FIG.10, el mab 20H4.9-IgG1 aumentó la síntesis de IFN-γ en los ensayos coestimuladores tanto en seres humanos como en monos hasta niveles significativamente más altos que en los controles. Los resultados de los estudios llevados a cabo con células T aisladas de 8 donantes humanos sanos mostraron que en seis de ellos, el mab 20H4.9-IgG1 aumentaba la síntesis de IFN-γ entre 2,2- 4,3 veces en comparación con los controles. Uno de los otros dos donantes mostró un aumento de 1,6 veces. El nivel de aumento fue superior al que se observó con hu39E3.G4, un anticuerpo anti-CD137 humanizado proporcionado en la Solicitud PCT publicada WO04/010947 que mostró un aumento de IFN-γ en 5 de 8 donantes y a niveles más bajos que el mab 20H4.9-IgG1 (aumento de 1,5 – 2 veces) (FIG. 10A). En los estudios coestimuladores de mono, el mab 20H4.9-IgG1 también demostró un aumento de la actividad funcional que dio como resultado un aumento significativo de IFN-γ con respecto a los controles (FIG. 10B). Como en los estudios con seres humanos, el aumento de IFN-γ fue consistentemente mayor que con hu39E3.G4.

También se observó la inducción de síntesis de TNF-α por encima de los niveles de control en cultivos humanos, aunque a niveles mucho menores que IFN-γ. Los niveles de TNF-α inducidos por el anticuerpo anti-CD3 solo (línea basal) eran aproximadamente de 20-50 veces menor que los niveles de la línea basal de IFN-γ. El mab 20H4.9-IgG1 inducía un aumento de ~ 2 a 4,7 veces en 3 de los 8 donantes. De nuevo, el hu39E3.G4 (ensayado en paralelo) inducía un aumento de ~ 2 veces en los mismos donantes pero a niveles más bajos. Otras citoquinas que se ensayaron, IL-2, IL-5, IL-10, e IL-4 no cambiaron significativamente con ningún tratamiento.

En conjunto, estos estudios demostraron que el mab 20H4.9-IgG1 presentaba la actividad funcional deseada tanto en seres humanos como en monos, induciendo una respuesta de tipo Th1. Significativamente, como la actividad antitumoral *in vivo* se asocia con la capacidad de los anticuerpos anti-CD137 para inducir la síntesis de IFN-γ, estos resultados apoyan la selección del mab 20H4.9-IgG1 para el cambio de isotipo.

Ejemplo 2: Caracterización *in vitro* del mab 20H4.9-IgG1

Basándose en su cinética de unión, la incapacidad para bloquear la interacción entre CD137-CD137L y los efectos funcionales sobre las células T humanas, se seleccionó el mab 20H4.9-IgG1 para cambiarlo a una forma IgG4. La forma IgG4 del mab 20H4.9-IgG1 es 20H4.9-IgG4 (representado en las FIG. 3 y 4).

La segunda fase de estos estudios implicaba la comparación de las propiedades *in vitro* del mab 20H4.9-IgG4 y el mab 20H4.9-IgG1. En esta sección, se describen las propiedades de cinética de unión y los efectos funcionales de ambos anticuerpos en linfocitos humanos y de mono.

Cinética de unión

Las propiedades cinéticas de los anticuerpos anti-CD137 humano se evaluaron por resonancia de plasmón superficial utilizando un instrumento BIAcore 3000. El antígeno, CD137 humano-IgG_{2a} murina, se inmovilizó covalentemente a baja densidad en la superficie de una microplaca sensora CM5. El mab 20H4.9-IgG4 y el mab 20H4.9-IgG1 se inyectaron a concentraciones entre 25 y 200 nM. La FIG. 11 representa las inyecciones a 100 nM de tanto el mab 20H4.9-IgG1 como del mab 20H4.9-IgG4. Los datos calculados utilizando el software BIAevaluation (análisis de ajuste de curva global, modelo bivalente) dieron como resultado unos parámetros de cinética que eran similares en ambos anticuerpos (véase la Tabla 1). Las constantes de disociación K_D para el mab 20H4.9-IgG1 y para el mab 20H4.9-IgG4 se determinaron como 11,2 y 16,6 nM, respectivamente. En condiciones experimentales similares, el mab 20H4.9-IgG4 no se une a 4-1BB murino.

Tabla 1 – Comparación de la cinética de unión del mab 20H4.9-IgG4 y el mab 20H4.9-IgG1

Anticuerpo	K _{a1} (1/Ms)	K _{d1} (1/s)	K _{a2} (1/UR)	K _{d2} (1/s)	R _{máx} (UR)	K _{A1}	K _{D1} (nM)
20H4.9-IgG1	3,43E+04	3,85E-04	2,30E-05	1,51E-03	262	8,91E+07	11,22
20H4.9-IgG4	3,92E+04	6,51E-04	0,0755	0,105	409	6,02E+07	16,61

Análisis de citometría de flujo

El mab 20H4.9-IgG4 biotinilado a concentraciones que varían de 0,32 ng/ml a 5 µg/ml se ensayó con respecto a su unión con las células CEM ± PMA-ionomicina. El mab 20H4.9-IgG4 se unió a las células CEM estimuladas por PMA-ionomicina de manera dependiente de la concentración. La saturación se alcanzó a 0,2 µg/ml. Por otro lado, como se ha demostrado para su molécula parental, mab 20H4.9-IgG1, el mab 20H4.9-IgG4 no se unía a las células CEM que no estaban estimuladas por PMA-ionomicina (FIG. 12). La unión dependiente de la concentración del mab 20H4.9-IgG4 se ha demostrado con las células CEM estimuladas con PMA-ionomicina (FIG. 12). Las muestras se

leyeron por citometría de flujo.

Ensayos celulares/ funcionales

Para confirmar que el proceso de cambio de isotipo del mab 20H4.9-IgG1 no alteraba la actividad del anticuerpo, se llevaron a cabo estudios *in vitro* para comparar la actividad del mab 20H4.9-IgG4 con respecto al mab 20H4.9-IgG1 parental en PBMC de mono y células T humanas. Los efectos funcionales del mab 20H4.9-IgG4 sobre las células T o PBMC humanas o de mono se determinaron y se compararon con su molécula parental, el mab 20H4.9-IgG1. Las células T primarias humanas o las PBMC de mono obtenidas de donantes sanos se estimularon con anticuerpo anti-CD3 (0,5 µg/ml-1 µg/ml) +/- anticuerpos anti-CD137 humano. Se midió la síntesis de IFN-γ después de 72 h de cultivo a 37 °C por matriz de perlas citométricas (CBA) para las muestras humanas o por ELISA para las muestras de mono. Los anticuerpos se ensayaron en ensayos coestimuladores en presencia de concentraciones subóptimas de anticuerpo anti-CD3 (1 µg/ml) o Concavalina A (1 µg/ml) (donantes M5170 y 81 solamente). Los resultados se expresan como el aumento en veces en pg/ml sobre los controles. Debido a la respuesta de fondo variable entre los donantes, los datos se normalizaron en relación con los tratamientos de control (=1). La FIG. 13A proporciona los resultados en las células T humanas y la FIG. 13B proporciona los resultados de las PBMC de mono. Como se muestra en las FIG. 13A-13B, el mab 20H4.9-IgG4 demostró propiedades coestimuladoras que daban lugar a niveles más altos de IFN-γ en células humanas y de mono en comparación con los controles. El nivel del aumento de la síntesis de IFN-γ era comparable con su molécula parenteral en las muestras humana y de mono.

Posteriormente, se evaluó el efecto del entrecruzamiento de anticuerpo sobre el efecto funcional del mab 20H4.9-IgG4. Se ha demostrado que el entrecruzamiento de los anticuerpos puede dar lugar a la potenciación de su capacidad de señalización. Así, se llevó a cabo un estudio para determinar la actividad funcional de varios lotes de mab 20H4.9-IgG4 ± un anticuerpo anti-IgG humana. Como se muestra en la FIG. 14A, se observó un aumento significativo de IFN-γ en todos los lotes ensayados en ausencia de anticuerpos de entrecruzamiento, con una meseta a concentraciones de 400 ng/ml. El aumento de la síntesis de IFN-γ por el mab 20H4.9-IgG4 aumentó más por adición del anticuerpo de entrecruzamiento anti-IgG humana como se muestra en la FIG. 14B. Los diferentes lotes de mab 20H4.9-IgG4 tenían actividades celulares comparables.

Por tanto, el entrecruzamiento del mab 20H4.9-IgG4 daba como resultado un aumento de la capacidad del anticuerpo para inducir la síntesis de IFN-γ. El entrecruzamiento de anticuerpo *in vivo* puede producirse por medio de receptores celulares para la parte Fc de las inmunoglobulinas o por dimerización del anticuerpo. El mab 20H4.9-IgG4 es del isotipo IgG4, el cual, en comparación con otros isotipos de IgG, tiene una afinidad baja por los receptores Fc. Sin embargo, las IgG4 pueden unirse a FcγRI (CD64) que se expresa en los monocitos y los neutrófilos.

Se han utilizado otras dos estrategias para caracterizar adicionalmente al mab 20H4.9-IgG4: (i) el efecto sobre la supervivencia de las células T y (ii) el efecto sobre la expresión de ciclina D2. Para determinar si el mab 20H4.9-IgG4 podía provocar la señalización a través de CD137 en las células T humanas y proporcionar señales coestimuladoras a las células T que dieran lugar al aumento de la supervivencia celular y la expansión, células T humanas estimuladas con anticuerpos anti-CD3 +/- mab 20H4.9-IgG4 a concentraciones que se sabía que inducían la síntesis de IFN-γ se tiñeron con anexina-V y yoduro de propidio para determinar el número de células vivas (negativas a Anexina V/yoduro de propidio) y con ciclina D2 para determinar su efecto sobre la progresión celular. La FIG. 15 muestra los resultados promedio de 4 lotes diferentes de mab 20H4.9-IgG4 sobre la expresión de ciclina D2 y la supervivencia de células T. Las concentraciones de mab 20H4.9-IgG4 de 0,4-10 µg/ml daban como resultado un aumento del número de células vivas de aproximadamente 1,8-2 veces y producían un aumento significativo en el número de células T que expresan ciclina D2 (2,5-3 veces).

Ejemplo 3: Evaluación *in vivo* de los anticuerpos 4-1BB en un modelo farmacocinético en monos cinomolgus

Este ejemplo ilustra la capacidad del mab 20H4.9-IgG4 y el mab hu39E3.G4 para aumentar la respuesta inmune específica de antígeno inducida por las vacunas de ADN.

Materiales y Procedimientos

Grupos animales experimentales: Los monos cinomolgus machos y hembras (2,5 a 5,0 kg) se adquirieron en Charles River BRF (Houston, Texas) para este estudio y se alojaron en parejas. Cada grupo experimental consistía en 4 machos y 2 hembras que se habían colocado al azar en grupos según el peso corporal. Los grupos experimentales eran de la manera siguiente:

- Grupo 1 – vacuna de ADN gag SIV y PSA (2 mg cada una), los días 0, 28, 56, i.m., más solución salina como control, i.v., los días 12, 15 y 19;
- Grupo 2 – vacuna de ADN gag SIV y PSA (2 mg cada una), los días 0, 28, 56, i.m., más mab hu39E3.G4, i.v., los días 12, 15 y 19;
- Grupo 3 – vacuna de ADN gag SIV y PSA (2 mg cada una), los días 0, 28, 56, i.m., más mab 20H4.9-IgG4, i.v., los días 12, 15 y 19;
- Grupo 4 – Grupo control sin tratamiento.

Inmunizaciones y tratamientos con anticuerpos: Las vacunas de ADN PSA y gag SIV se obtuvieron de David B. Weiner, Departamento de Patología y Laboratorio de Medicina, Universidad de Pensilvania. (Véase, Kim y col., *Oncogene* 20, 4497-4506 (2001); Muthumani y col., *Vaccine* 21, 629-637 (2003)).

5 Los monos se inmunizaron por la vía intramuscular con construcciones de ADN PSA y gag SIV (2 mg/construcción/inmunización) simultáneamente, seguido por dos refuerzos con 4 semanas de separación (días 0, 28 y 56). Doce días después de la inmunización inicial, se inició el tratamiento con mab 20H4.9-IgG4 o mab hu39E3.G4. Se administraron los anticuerpos i.v., a 50 mg/kg, los días 12, 15 y 19 después de la primera inmunización. Este protocolo se eligió debido a que demostró que suprimía la respuesta de anticuerpo frente al mab hu39E3.G4.

10 Clínica y Patología clínica

A lo largo del curso del estudio se llevaron a cabo exámenes físicos en todos los monos por los veterinarios encargados. Se recogieron muestras de sangre para análisis de hematología y de bioquímica sérica antes de las vacunaciones y luego 12, 42, 70, 97, 134 y 168 días después de las inmunizaciones.

Ensayos inmunológicos

15 Para determinar el efecto de las respuestas inmunes inducidas por estos regímenes terapéuticos, se utilizó un ensayo de puntos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISPOT) para la detección de la producción de IFN- γ por los linfocitos estimulados por el antígeno específico. Las muestras de sangre para los análisis ELISPOT se recogieron antes de las vacunaciones y después a los 12, 42, 70, 97, 134 y 168 días después de las inmunizaciones. Se utilizaron péptidos sintéticos correspondientes a las secuencias completas del antígeno gag SIV y PSA para la estimulación *ex vivo* de PBMC.

Resultados

25 Se cuantificaron las células secretoras de IFN- γ específicas de antígeno en respuesta a los péptidos PSA o gag SIV por ELISPOT. La FIG. 16 (FIG. 16A-16D) ilustra los resultados obtenidos de los Grupos 1-4 respectivamente. El nivel de respuesta al PSA fue muy bajo en todos los grupos, indicando que la vacuna por sí misma no inducía una respuesta inmune medible y consistente cuando se comparaba con los animales no vacunados. Por otro lado, la vacunación sola con gag SIV dio como resultado un número significativo de células secretoras de IFN- γ específicas de antígeno que aumentaba con el tiempo (FIG. 16A). Los animales sin tratar (no vacunados) mostraron 100-1.000 puntos/ 10^6 PBMC a lo largo del curso del estudio (FIG. 16D). Estos resultados establecieron la respuesta umbral a la vacuna; los animales que presentaron < 1.000 puntos/ 10^6 PBMC se consideró que no respondían. En el grupo de animales que recibieron la vacuna, 5 de 6 monos mostraron una respuesta aumentada a lo largo del tiempo, con un número medio de puntos después de la tercera inmunización (día 70) de 1.727 puntos/ 10^6 PBMC (DT=242, intervalo=1.403-1.068 puntos/ 10^6 PBMC). Un mono se consideró que no respondía (620 puntos/millón de PBMC). Ya que en estos estudios no se hizo la tipificación de CMH, es probable que la falta de respuesta de las células T a la vacuna por parte de algunos monos pueda deberse a un error de coincidencia con CMH. Notablemente, en el día 35 70, 4 de 6 animales tratados con gag SIV más mab 20H4.9-IgG4 presentaron un número significativamente más alto de puntos de IFN- γ (FIG. 16C) en comparación con los animales de control (FIG. 16D) y con macacos que se inmunizaron con vacunas de ADN en solitario (FIG. 16A). El número medio de puntos después de la tercera inmunización para el grupo tratado con el mab 20H4.9-IgG4 fue de 3.465 puntos/ 10^6 PBMC (DT=1.236, intervalo=2.070-4.780 puntos/ 10^6 PBMC). Dos monos en ese grupo no respondieron a la vacuna (< 800 puntos/millón PBMC). A continuación de la tercera inmunización (día 70), el tratamiento con mab hu39E3.G4 más vacuna de ADN dio como resultado 6 de los 6 animales que se consideró como que respondieron con un número medio de puntos/ 10^6 PBMC de 2.348 (DT=588, intervalo=1.738-3.283) (FIG. 16B). Para este grupo, el intervalo del número de puntos era más bajo en comparación con los macacos tratados con mab 20H4.9-IgG4.

45 El tratamiento con tanto mab 20H4.9-IgG4 como mab hu9E3.G4, se toleró bien y no produjo ningún cambio significativo en los signos clínicos, los parámetros de química clínica, o parámetros hematológicos en relación con los monos control.

50 Estos datos muestran que el tratamiento con mab 20H4.9-IgG4 en combinación con una vacuna de ADN provocaba un aumento de la magnitud *in vivo* de la respuesta celular específica al antígeno de ensayo en relación a los controles o al tratamiento con hu39E3.G9, medido mediante las células secretoras de IFN- γ específicas de antígeno. Ya que se utilizó un solo nivel de dosis de los anticuerpos y un solo régimen de dosificación en estos estudios preliminares, es poco probable que se indujeran respuestas máximas y es necesario trabajo adicional para optimizar las condiciones. Claramente, sin embargo, incluso con este protocolo no optimizado, se consiguió una mejora de la respuesta celular frente a los antígenos de ensayo con el mab 20H4.9-IgG4, sugiriendo que la modulación de la función de CD137 puede ser una estrategia atractiva para aumentar la eficacia de las vacunas de ADN.

55

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Jure-Kunkel, Maria Hefta, Laura Santoro, Marc Ganguly, Subinay
- 5 <120> ANTICUERPOS ENTERAMENTE HUMANOS CONTRA 4-1BB HUMANO
- <130> 10060 PCT
- <150> US 60/510193
- 10 <151> 10-10-2003
- <150> Pendiente de asignación
- <151> 08-10-2004
- 15 <160> 9
- <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1
- 20 <211> 7057
- <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>
- 25 <223> Secuencia artificial
- <400> 1

```

cgatgtacgg gccagatata cgcggtgaca ttgattattg actagttatt aatagtaatc      60
aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcggtacat aacttacggt      120
aaatggcccg cctggctgac cgcccaacga ccccgccca ttgacgtcaa taatgacgta      180
tgttcccata gtaacgcca tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg actatttacg      240
gtaaactgbc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga      300
cgtcaatgac ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag tacatgaect tatgggactt      360
tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatggtga tgcggttttg      420
gcagtacatc aatgggcgtg gatagcggtt tgactcacgg ggatttcaa gtctccacc      480
cattgacgtc aatgggagtt tgttttgca ccaaatcaa cgggactttc caaatgtcg      540
taacaactcc gcccattga cgcaaatggg cggtagcgt gtacgggtgg aggtctatat      600
aagcagagct ctctggctaa ctagagaacc cactgcttac tggcttatcg aaattaatac      660
gactcactat agggagacc aagcttggt cgcctatgaa acacctgtgg ttcttctcc      720
tcctggtgge agctcccaga tgggtcctgt ccaggtgca actacagcag tggggcgag      780
gactgttga gacctcggag accctgtccc tcacctgcgc tgtctatggt gggctctca      840
gtggttacta cctggcctgg atacgccagt cccagagaa ggggctggag tggattgggg      900

```


ES 2 432 357 T3

aatcaatca tgggggatac gtcacctaca atccgtccct cgagagtcga gtcaccatat 960
 cagtagacac gtccaagaac cagttctccc tgaagctgag ctctgtgacc gccgcggaca 1020
 cggtgtata ttactgtgag agggactatg gtccggggaa ttatgactgg tacttcgatc 1080
 tctggggccg tggcaccctg gtcactgtct cctcagctag caccaagggc ccatccgtct 1140
 tccccctggc gccctgctcc agggacacct ccgagagcac agccgccctg ggctgcctgg 1200
 tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg 1260
 gcgtgcacac cttccccgct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg 1320
 tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc 1380
 ccagcaacac caagggtggc aagagagttg agtccaaata tggccacact tgcccacctt 1440
 gccagcacc tgagttcctg gggggaccat cagtcttctt gttccccca aaaccaagg 1500
 acactctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgcgt ggtgggtggc gtgagccagg 1560
 aagaccccgga ggtccagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaaga 1620
 caaagcccgcg ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc 1680
 tgcaccagga ctggtgaac ggcaaggagt acaagtcaa ggtctccaac aaaggcctcc 1740
 cgtctccat cgagaaaacc atctccaaag ccaagggca gccccgagag ccacaggtgt 1800
 acaccctgcc cccatcccag gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg 1860
 tcaaaggctt ctaccocagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga 1920
 acaactacaa gaccacgct cccgtgctgg actccgacgg ctctctctc ctctacagca 1980
 ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg aggggaatgt cttctcatgc tccgtgatgc 2040
 atgaggctct gacccacact taccacacag agagctctc cctgctctc ggtacatpat 2100
 ctgaggggcc ctattctata gtgtcaccta aatgctagag ctgctgatc agcctcgact 2160
 gtgcttcta gttgccagcc atctgttgtt tgcctctccc ccgtgcttc cttgacctg 2220
 gaaggtgcca ctcccactgt cctttcctaa taaaatgagg aaattgcac gcattgtctg 2280
 agtaggtgtc attctattct ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg 2340
 gaagacaata gcaggcatgc tgggatgagc gtgggctcta tggcttctga ggcggaaga 2400
 accagctggg gctctagggg gtatccccac gcgccctgta gcggcgattt aagcgcggcg 2460
 ggtgtggtg ttacgcgcag cgtgaccgct acacttgcca gcgccctagc gcccgctcct 2520
 ttcgctttct tcccttctt tctcgccagc ttcgccggc ctctcaaaa agggaaaaaa 2580
 agcatgcac tcaattagc agcaaccata gtcccggccc taactccgc catcccggc 2640

ES 2 432 357 T3

ctaactccgc ccagttccgc ccatttcccg ccccatggct gactaatttt ttttatttat 2700
 gcagaggccg aggccgcctc ggcctctgag ctattccaga agtagtgagg aggctttttt 2760
 ggaggcctag gcttttgcaa aaagcttga cagctcaggg ctgcgatttc gcgccaaact 2820
 tgacggcaat cctagcgtga aggctggtag gattttatcc ccgctgccat catggttcga 2880
 ccattgaact gcatcgtcgc cgtgtcccaa aatatgggga ttggcaagaa cggagaccta 2940
 ccctggcctc cgctcaggaa cgagttcaag tacttccaaa gaatgaccac aacctcttca 3000
 gtggaaggta aacagaatct ggtgattatg ggtaggaaaa cctggttctc cattcctgag 3060
 aagaatcgac ctttaaagga cagaattaat atagttctca gtagagaact caaagaacca 3120
 ccacgaggag ctcatTTTTt tgccaaaagt ttggatgatg ccttaagact tattgaacaa 3180
 ccggaattgg caagtaaagt agacatggtt tggatagtcg gaggcagttc tgtttaccag 3240
 gaagccatga atcaaccagg ccaccttaga ctctttgtga caaggatcat gcaggaattt 3300
 gaaagtgaca cgtttttccc agaaattgat ttggggaaat ataaacttct cccagaatac 3360
 ccaggcgtcc tctctgaggt ccaggaggaa aaaggcatca agtataagtt tgaagtctac 3420
 gagaagaaag actaacagga agatgctttc aagttctctg ctccccctct aaagctatgc 3480
 atttttataa gaccatggga cttttgctgg ctttagatct ctttgtgaag gaaccttact 3540
 tctgtggtgt gacataattg gacaaactac ctacagagat ttaaagctct aaggtaaata 3600
 taaaattttt aagtgtataa tgtgttaaac tactgattct aattgtttgt gtattttaga 3660
 ttccaacctc tggaaactgat gaatgggagc agtggtgga tgcctttaat gaggaaaacc 3720
 tgttttgctc agaagaaatg ccacttagtg atgatgaggc tactgctgac tctcaacatt 3780
 ctactcctcc aaaaaagaag agaaaggtag aagaccccaa ggactttctt tcagaattgc 3840
 taagttttt gagtcatgct gtgtttagta atagaactct tgcctgcttt gctatttaca 3900
 ccacaaagga aaaagctgca ctgctataca agaaaattat ggaaaaatat tctgtaacct 3960
 ttataagtag gcataacagt tataatcata acatactgtt ttttcttact ccacacaggc 4020
 atagagtgtc tgctattaat aactatgctc aaaaattgtg taccttttagc tttttaattt 4080
 gtaaaggggt taataaggaa tatttgatgt atagtgcctt gactagagat cataatcagc 4140
 cataccacat ttgtagaggt ttacttctgt ttaaaaaacc tcccacacct cccctgaac 4200
 ctgaaacata aatgaatgc aattggtgtt gttacttctt ttattgcage ttataatggt 4260
 taaaaataaa gcaatagcat cacaaatttc acaataaag catttttttc actgcattct 4320
 agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctggatcgg ctggatgatc 4380
 ctccagcgcg gggatctcat gctggagttc ttcgccacc ccaacttgtt tattgcagct 4440

ES 2 432 357 T3

tataatgggtt acaataaag caatagcatc acaaatcca caataaagc atttttttca 4500
ctgcattcta gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt ctgtataaccg 4560
tcgacctcta gctagagctt ggcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt 4620
tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctgggggt 4680
gcctaatagag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagctg 4740
ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atoggccaac gcgcggggag aggcgggttg 4800
cgtattgggc gctctccgc ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggg cgttcggctg 4860
cggcgagcgg taccagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat 4920
aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc 4980
gcgttgctgg cgtttttcca taggtccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc 5040
tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga 5100
agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt 5160
ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcaa tgctcacgct gtaggtatct cagttcggtg 5220
taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg caccgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc 5280
gccttatecg gtaactatcg tcttgagtc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg 5340
gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtc tacagagttc 5400
ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg 5460
ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc 5520
gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct 5580
caagaagatc ctttcatctt ttctacggg tctgacgctc agtggaaaga aactccaggt 5640
taagggattt tggctatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa 5700
aatgaagtt ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggctctga cagttaccaa 5760
tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcttccatc catagttgcc 5820
tgactccccg tcgtgatag aactacgata cgggagggct taccatctgg cccagtgct 5880
gcaatgatac cgcgagacc acgctcaccg gctccagatt taccagcaat aaaccagcca 5940
gccggaaggg ccgagcgcag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat ccagttctatt 6000
aattgttgcg ggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttgtt 6060
gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc 6120
ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaa agcggttagc 6180

ES 2 432 357 T3

tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttacc actcatggtt 6240
atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact 6300
ggtagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc 6360
ccggcgtaaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt 6420
ggaaaacggt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg 6480
atgtaacca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct 6540
gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa 6600
tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt 6660
ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc 6720
acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc gacggatcgg gagatctgct aggtgacctg 6780
aggcgcgcgc gcttcgaata gccagagtaa cctttttttt taattttatt ttattttatt 6840
tttgagatgg agtttggcgc cgaatccccg atcccctatg gtcgactctc agtacaatct 6900
gctctgatgc cgcatagtta agccagtacc tgctccctgc ttgtgtgttg gaggtcgcgtg 6960
agtagtgccg gagcaaaatt taagctacaa caaggcaagg cttgaccgac aattgcatga 7020
agaatctgct tagggtagg cgttttgcgc tgcttcg 7057

<210> 2
<211> 7057
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> Secuencia artificial

10

<400> 2

gtacatgcc cggctctatg gcgcaactgt aactaataac tgatcaataa ttatcattag 50
ttaatgcccc agtaatcaag tatcgggtat atacctcaag gcgcaatgta ttgaatgcca 120
tttaccgggc ggaccgactg gcgggttgct gggggcgggt aactgcagtt attactgcat 180
acaagggtat cattgcggtt atccctgaaa ggtaactgca gttaccacc tgataaatgc 240
catttgaccg gtgaaccgtc atgtagtcca catagtatac ggttcagtgc ggggataact 300
gcagttactg ccatttaccg ggcggaccgt aatcggggtc atgtactgga ataccctgaa 360
aggatgaacc gtcattgaga tgcataatca gtacgataa tggtagcact acgccaatac 420
cgtcatgtag ttaccgcacc ctatcgccaa actgagtgcc cctaaagggt cagaggtggg 480
gtaactgcag ttaccctcaa acaaaaccgt ggttttagtt gccctgaaag gttttacagc 540
attgttgagg cggggtaact gcgtttaccg gccatccgca catgccacc tccagatata 600

ES 2 432 357 T3

ttcgtctcga gagaccgatt gatctcttgg gtgacgaatg accgaatagc ttttaattatg 660
 ctgagtata tccctctggg ttcgaaccat ggcggtactt tgtggacacc aagaaggagg 720
 aggaccaccg tcgagggtct acccaggaca ggggccacgt tgatgtcgtc accccgcgtc 780
 ctgacaactt cggaaacctc tgggacaggg agtggacgcg acagatacca cccaggaagt 840
 caccaatgat gacctcgacc tatgctgtca ggggtctctt ccccgacctc acctaaccct 900
 tttagttagt accacctatg cagtggatgt taggcaggga gctctcagct cagtgtata 960
 gtcattctgt caggttcttg gtcaagaggg acttcgactc gagacactgg cggcgctctg 1020
 gccgacatat aatgacacgc tccctgatac caggcccctt aatactgacc atgaagctag 1080
 agaccccgcc accgtgggac cagtgcaga gtagtcgatc gtggttcccg ggtaggcaga 1140
 agggggaccg cgggacgagg tctctgtgga ggtctctgtg tcggcgggac ccgacggacc 1200
 agttctgat gaaggggctt ggccactgcc acagcacctt ggtccgctg gactggtcgc 1260
 cgcacgtgtg gaagggccga caggatgtca gtagtctga gatgaggag tcgtcgacc 1320
 actggcacgg gaggtcgtc aaccctgtct tctggatgtg gacgttgcct ctagtgttcg 1380
 ggtcgttctg gttccacctg ttctctcaac tcaggttat accaggtgga acgggtgaa 1440
 cgggtcgtg actcaaggac cccctgtgta gtcagaagga caagggggt tttgggtcc 1500
 tgtgagagta ctgagggcc tgggactcc agtgcacgca ccaccacctg cactcgtcc 1560
 ttctgggct ccaggtcaag ttgacctgc acctaccgca cctccacctg ttacggtct 1620
 gtttcggcgc cctctctgtc aagtgtctg gcatggcaca ccagtcgag gagtggcagg 1680
 acgtggtcct gaccgacttg ccgttctca tgttcacgtt ccagaggtg tttccggagg 1740
 gaggagagta gctctctgtg gagaggtacc gcttccctg aggtgctcct ggtgtcaca 1800
 tgtgggacgg ggttaggtc ctctctact ggttcttggc ccagtcggac tggacggacc 1860
 agtttccgaa gatggggtc ctgtagcggc acctcacct ctcgttacc gtcggcctct 1920
 tgttgatgtt ctggtgcgga gggcacgacc tgaggctgcc gaggaagaag gagatgtct 1980
 ccgattgca cctgttctc tccacctcc tcccctaca gaagagtac aggcactacg 2040
 tactccgaga cgtgttggg atgtgtctt tctcggagag ggacagagac ccatttacta 2100
 gatctcccgg gataagatat cacagtggat ttacgatctc gagcactag tcggagetga 2160
 cacggaagat caacggtcgg tagacaaca acggggagg ggcacggaag gaactgggac 2220
 cttccacggt gaggtgaca gaaaggatt atttactcc tttacgtag cgtaacagac 2280
 tcatccacag taagataaga cccccacc caccctctc tctcttccc cctcctaacc 2340

ES 2 432 357 T3

cttctgttat cgteccgtacg acccctacgc caccggagat accgaagact ccgcctttct 2400
 tggtcgaccc cgagatcccc cataggggtg cgcgggacat cgccgcgtaa ttcgcccgc 2460
 ccacaccacc aatgcgcgtc gcactggcga tgtgaacggt cgcgggatcg cgggcgagga 2520
 aagcgaaaga agggaaaggaa agagcgggtc aagcggcccg gagagttttt tccctttttt 2580
 tcgtacgtag agttaatcag tcgttggtat cagggcgggg attgagggcg gttagggcggg 2640
 gattgaggcg ggtcaaggcg ggtaagaggc ggggtaccga ctgattaataaaa aaaataaata 2700
 cgtctccgpc tccggcggag ccggagactc gataaggtct tcatcactcc tccgaaaaaa 2760
 cctccggatc cgaaaacggt tttcgaacct gtcgagtccc gacgctaaag cgcggtttga 2820
 actgccgta ggatcgcact tccgaccatc ctaaaatagg ggcgacgga gtaccaagct 2880
 ggtaacttga cgtagcagcg gcacagggtt ttataccct aaccgttctt gcctctggat 2940
 gggaccggag gcgagtcctt gctcaagttc atgaaggttt cttactggg ttggagaagt 3000
 caccttccat ttgtcttaga ccactaatac ccctcctttt ggaccaagag gtaaggactc 3060
 ttcttagctg gaaatttctt gtcttaatta tatcaagagt catctcttga gtttcttgg 3120
 ggtgctctc gagtaaaaga acggttttca aacctactac ggaattctga ataacttgtt 3180
 ggccttaacc gttcatttca tctgtaccaa acctatcagc ctccgtcaag acaaatggtc 3240
 cttcggtaact tagttggtcc ggtggaatct gagaaacact gttcctagta cgtccttaaa 3300
 ctttactgt gcaaaaaggg tctttaacta aaccttcta tatttgaaga gggcttatg 3360
 ggtccgcagg agagactcca ggtcctcctt tttccgtagt tcatattcaa acttcagatg 3420
 ctcttcttcc tgattgtcct tctacgaaag ttcaagagac gaggggagga tttcgatacg 3480
 taaaaatatt ctggtaccct gaaaacgacc gaaatctaga gaaacactt cttggaatga 3540
 agacaccaca ctgtattaac ctgttgatg gatgtctcta aatttcgaga tccatttat 3600
 attttaaaaa ttcacatatt acacaattg atgactaaga ttaacaaaca cataaatct 3660
 aaggttgat accttgacta cttaccctcg tcaccacctt acggaaatta ctcttttgg 3720
 acaaaacgag tcttctttac ggtagatcac tactactccg atgacgactg agagtgttaa 3780
 gatgaggagg ttttttcttc tcttccatc ttctggggtt cctgaaagga agtcttaacg 3840
 attcaaaaaa ctcagtacga cacaatcat tatcttgaga acgacgaaa cgataaatgt 3900
 ggtgttctct ttttcgacgt gacgatatgt tcttttaata cttttttata agacattgga 3960
 aatattcatc cgtattgtca atattagtat tgtatgacaa aaaagaatga ggtgtgtccg 4020
 tatctcacag acgataatta ttgatacgag tttttaacac atggaaatcg aaaaattaa 4080
 catttccca attattcctt ataaactaca tatcacgga ctgatctcta gtattagtcg 4140

gtatgggtga aacatctcca aaatgaacga aatTTTTTgg aggggtgtgga gggggacttg 4200
 gactttgtat ttactttacg ttaacaacaa caattgaaca aataacgtcg aatattacca 4260
 atgtttattt cgttatcgta gtgtttaaag tgtttatttc gtaaaaaaag tgacgtaaga 4320
 tcaacaccaa acaggtttga gtagttacat agaatagtac agacctagcc gacctactag 4380
 gaggtcgcgc ccctagagta cgacctcaag aagcgggtgg ggttgaacaa ataacgtcga 4440
 atattaccaa tgtttatttc gttatcgtag tgtttaaagt gtttatttcg taaaaaaagt 4500
 gacgtaagat caacaccaa caggtttgag tagttacata gaatagtaca gacatatggc 4560
 agctggagat cgatctcgaa ccgcattagt accagtatcg acaaaggaca cactttaaca 4620
 atagggcagt gttaagggtt gttgtatgct cggccttcgt atttcacatt tcggacccca 4680
 cggattactc actcgattga gtgtaattaa cgcaacgcga gtgacggggc aaaggtcagc 4740
 cctttggaca gcacggtcga cgtaattact tagccgggtg cgcgcccctc tccgccaaac 4800
 gcataaccgc cgagaaggcg aaggagcgag tgactgagcg acgagagcca gcaagccgac 4860
 gccgctcgcc atagtcgagt gagtttccgc cattatgcca ataggtgtct tagtccccta 4920
 ttgcgtcctt tcttgtaac tcgttttccg gtcgttttcc ggtccttggc atttttccgg 4980
 cgcaacgacc gcaaaaaggt atccgagcg gggggactgc tcgtagtgtt tttagctgcg 5040
 agttcagtct ccaccgctt gggctgtcct gatatttcta tggccgcaa agggggacct 5100
 tcgagggagc acgagagagc acaaggctgg gacggcgaat ggcctatgga caggcggaaa 5160
 gagggaaacc cttcgcaccg cgaaagagtt acgagtgcga catccataga gtcaagccac 5220
 atccagcaag cgaggttcga cccgacacac gtgcttgggg ggcaagtcgg gctggcgagc 5280
 cggaaataggc catttatagc apaactcagg ctggccatt ctgtgctgaa tagcggtagc 5340
 cgtcgtcggg gaccattgtc ctaatcgtct cgctccatac atccgccacg atgtctcaag 5400
 aacttaccac ccggattgat gccgatgtga tcttctgtc ataaaccata gacgcgagac 5460
 gacttcggtc aatggaagcc tttttctcaa ccatcgagaa ctaggccgtt tgtttggtgg 5520
 cgaccatcgc caccaaaaa acaaacgttc gtcgtctaata gcgcgtcttt ttttctaga 5580
 gttcttctag gaaactagaa aagatgcccc agactcgcgag tcaccttgct tttgagtaca 5640
 attccctaaa accagtactc taatagttt tcctagaagt ggatctagga aaatttaatt 5700
 ttacttcaa aatttagtta gatttcatat atactcattt gaaccagact gtcaatggtt 5760
 acgaattagt cactccgtgg atagagtcgc tagacagata aagcaagtag gtatcaacgg 5820
 actgaggggc agcacatcta ttgatgctat gccctcccga atggtagacc ggggtcacga 5880

ES 2 432 357 T3

cgttactatg gcgctctggg tgcgagtggc cgaggctctaa acagtcgta tttggtcggt 5940
 cggccttccc ggctcgcgtc ttcaccagga cgttgaata ggcggaggta ggtcagataa 6000
 ttaacaacgg cccttcgatc tcattcatca agcggtaaat tatcaaacgc gttgcaacaa 6060
 cggtaacgat gtccgtagca ccacagtgcg agcagcaaac cataccgaag taagtgcagg 6120
 ccaagggttg ctagtccgc tcaatgtact aggggttaca acacgttttt tcgccaatcg 6180
 aggaagccag gaggctagca acagtcttca ttcaaccggc gtcacaatag tgagtaccaa 6240
 taccgtcgtg acgtattaag agaatgacag tacggtaggc attctacgaa aagacactga 6300
 ccaactcatga gttggttcag taagactctt atcacatacg ccgctggctc aacgagaacg 6360
 ggccgcagtt atgccctatt atggcgcggg gtatcgtctt gaaattttca cgagttagtaa 6420
 ccttttgcaa gaagccccgc ttttgagagt tcctagaatg gcgacaactc taggtcaagc 6480
 tacattgggt gagcacgtgg gttgactaga agtcgtagaa aatgaaagtg gtcgcaaaga 6540
 cccactcgtt tttgtccttc cgttttacgg cgttttttcc cttattcccg ctgtgccttt 6600
 acaacttatg agtatgagaa ggaaaaagtt ataataactt cgtaaatagt cccaataaca 6660
 gagtactcgc ctatgtataa acttacataa atctttttat ttgtttatcc ccaaggcgcg 6720
 tgtaaagggg cttttcacgg tggactgcag ctgcctagcc ctctagacga tccactggac 6780
 tccgcgcggc cgaagcttat cggctctcatt ggaaaaaaaa attaaaataa aataaaaataa 6840
 aaactctacc tcaaaccgcg gctagagggc taggggatac cagctgagag tcatgttaga 6900
 cgagactacg gcgtatcaat tcggtcatag acgagggacg aacacacaac ctccagcgac 6960
 tcatcacgag ctcgttttaa attcgatgtt gttccgttcc gaactggctg ttaacgtact 7020
 tcttagacga atcccaatcc gcaaaaacgcg acgaagc 7057

<210> 3
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia artificial

10

<400> 3

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
 1 5 10 15
 Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
 20 25 30

ES 2 432 357 T3

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
 35 40 45

Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro
 65 70 75 80

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

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp
 115 120 125

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

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
 145 150 155 160

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

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

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

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
 210 215 220

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

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

ES 2 432 357 T3

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Gly Lys
 465

5 <210> 4
 <211> 6435
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia artificial

<400> 4

ES 2 432 357 T3

gacggatcgg gagatctgct agccccgggtg acctgaggcg cgccggcttc gaatagccag 60
agtaaccttt ttttttaatt ttattttatt ttatttttga gatggagttt ggcgccgatc 120
tcccgatccc ctatggtcga ctctcagtac aatctgctct gatgccgat agttaagcca 180
gtatctgctc cctgcttggtg tgttggagggt cgtgagtag tgcgcgagca aaatttaagc 240
tacaacaagg caaggcttga ccgacaattg catgaagaat ctgcttaggg ttaggcgttt 300
tgcgctgctt cgcgatgtac gggccaagata tacgcgttga cattgattat tgactagtta 360
ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac 420
ataacttacg gtaaatggcc cgcctggctg accgcccaac gacccccgcc cattgacgtc 480
aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt 540
ggagtattta cggtaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac 600
gccccctatt gacgtcaatg acggtaaatg gcccgctgg cattatgcc agtacatgac 660
cttatgggac tttcctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt 720
gatgcggttt tggcagtaca tcaatgggcg tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc 780
aagtctccac cccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt 840
tccaaaatgt cgtaacaact ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg 900
ggagggtctat ataagcagag ctctctggct aactagagaa cccactgctt actggcttat 960
cgaaattaat acgactcact ataggagac ccaagcttat caacaagttt gtacaaaaaa 1020
gcaggctggg accatggaag ccccagctca gcttctcttc ctctgctac tctggctccc 1080
agstaccacc ggagaasttg tgtgacaca gtctccagcc accctgtctt tgtctccagg 1140
ggaaagagcc accctctcct gcagggccag tcagagtgtt agcagctact tagcctggta 1200
ccaacagaaa cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gatgcatcca acagggccac 1260
tggcatccca gccaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag 1320
cagcctagag cctgaagatt ttgcagttta ttactgtcag cagcgtagca actggcctcc 1380
ggcgtcact ttcggcggag ggaccaaggt ggagatcaaa cgtacggtgg ctgcaccatc 1440
tgtcttcac tccccccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg 1500
cctgctgaat aactctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgcctt 1560
ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag 1620
cctcageagc accctgacgc tgagcaaaag agactacgag aaacacaaag tctacgctg 1680

ES 2 432 357 T3

cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg 1740
 ttagaccag ctttcttgta caaagtgggt gatctagagg gccctattct atagtgtcac 1800
 ctaaagtcta gagctcgctg atcagcctcg actgtgcctt ctagtgtcca gccatctgtt 1860
 gtttgcccct cccccgtgcc ttccttgacc ctggaagggt ccactccac tgcctttcc 1920
 taataaaatg aggaaattgc atgcattgt ctgagtaggt gtcattctat tctggggggt 1980
 ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca atagcaggca tgctggggat 2040
 gcggtgggct ctatggcttc tgaggcggaa agaaccagct ggggctctag ggggtatccc 2100
 cacgcgccct gttagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc 2160
 gctacacttg ccagcgcctc agcgcctcgt ccttctcgtt tcttcccttc ctttctcgcc 2220
 acgttcgccc ggctctcaa aaaagggaaa aaaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc 2280
 atagtccgc ccctaactcc gcccatccc cccctaactc cgcccagttc cgcccattct 2340
 ccgccccatg gctgactaat ttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc ctcggcctct 2400
 gagctattcc agaagtgtg aggaggcttt tttggaggcc taggcttttg caaaaagctt 2460
 ggggggacag ctcagggtg cgatttcgcg ccaaacttga cggcaatcct agcgtgaagg 2520
 ctggtaggat tttatccccg ctgccatcat ggttcgacca ttgaactgca tcgtcggct 2580
 gtcccaaat atggggattg gcaagaacgg agacctacc tggcctccgc tcaggaacga 2640
 gttcaagtac ttcaaagaa tgaccacaac ctcttcagtg gaaggtaaac agaactctgt 2700
 gattatgggt aggaaaacct ggttctccat tcttgagaag aatcgacctt taaaggacag 2760
 aattaatata gttctcagta gagaactcaa agaaccacca cgaggagctc attttcttgc 2820
 caaaagttg gatgatgcct taagacttat tgaacaaccg gaattggcaa gtaaagtaga 2880
 catggtttg atagtcggag gcagttctgt ttaccaggaa gccatgaatc aaccaggcca 2940
 cctcagactc tttgtgacaa ggatcatgca ggaattgaa agtgacacgt ttttcccaga 3000
 aattgattg gggaaatata aacttctccc agaataccca ggcgtctctc ctgaggtcca 3060
 ggaggaaaaa ggcataagt ataagtttga agtctacgag aagaaagact aacaggaaga 3120
 tgcttcaag ttctctgctc ccctcctaaa gctatgcatt ttataagac catgggactt 3180
 ttgctggctt tagatctgat cttgtgaag gaacctact tctgtggtg gacataattg 3240
 gacaaactac ctacagagat ttaaagctct aaggtaaata taaaattttt aagtgtataa 3300
 tgtgttaaac tactgattct aattgtttgt gtattttaga ttccaacctc tggaaactgat 3360
 gaatgggagc agtgggtgaa tgcctttaat gaggaaaacc tgttttgctc agaagaaatg 3420
 ccactctagt atgatgaggc tactgctgac tctcaacatt ctactcctcc aaaaaagaag 3480.

ES 2 432 357 T3

agaaaggtag aagaccccaa ggactttcct tcagaattgc taagtttttt gagtcatgct 3540
 gtgttttagta atagaactct tgcttgcttt gctatttaca ccacaaagga aaaagctgca 3600
 ctgctataca agaaaattat ggaaaaatat tctgtaacct ttataagtag gcataacagt 3660
 tataatcata acatactggt ttttcttact ccacacaggc atagagtgtc tgctattaat 3720
 aactatgctc aaaaattgtg taccttttagc tttttaattt gtaaaggggt taataaggaa 3780
 tatttgatgt atagtgcctt gactagagat cgatcataat cagccatacc acatttgtag 3840
 aggttttact tgctttaaaa aacctcccac acctccccct gaacctgaaa cataaaatga 3900
 atgcaattgt tgttgtaaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata 3960
 gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagtgtg ggtttgcca 4020
 aactcatcaa tgtatcttat catgtctgga teggtggat gatcctccag cgcggggatc 4080
 tcatgctgga gttcttcgcc caccocaaact tgtttattgc agcttataat ggttacaat 4140
 aaagcaatag catcacaaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg 4200
 gtttgccaa actcatcaat gtatcttatac atgtctgtat accgtcgacc tctagctaga 4260
 gcttgcgta atcatggtea tagctgtttc ctgtgtgaaa ttgttatccg ctcaaatc 4320
 cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg gggtgccata tgagttagct 4380
 aactcacatt aattgcgttg cgctcactgc ccgctttcca gtcgggaaac ctgctgtgcc 4440
 agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagagggcg tttgcgtatt gggcgtctt 4500
 ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggctgttcg gctgcggcga gcggtatcag 4560
 ctactcaaa ggcgtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca ggaaagaaca 4620
 tgtgagcaaa aggccagca aagcccgga accgtaaaaa ggcgcgctt ctggcgttt 4680
 tccataggt ccgccccct gacgagcacc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc 4740
 gaaaccgac aggaactata agataccagg cgtttccccc tggaaagctc ctctgtcgt 4800
 ctctgttcc gacctgccc ctaccggat acctgtccc ctttctcct tcgggaagcg 4860
 tggcgtttc tcatagctca cgtgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca 4920
 agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg ctgcccctta tccgtaact 4980
 atcgtcttga gtccaaccg gtaagacagc acttatcgcc actggcagca gccactggta 5040
 acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tgggtgccta 5100
 actacggcta cactagaagg aacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc 5160
 ttcggaaaa gagttgtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgt 5220

ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga agatcctttg 5280
 atcttttcta cggggctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc 5340
 atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaa 5400
 tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag 5460
 gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgcctgact ccccgctgtg 5520
 tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga 5580
 gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag 5640
 cgcagaagtg gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgcccggaa 5700
 gctagagtaa gtagttcggc agttaatagt ttgcgcaacg ttggtgcat tgctacaggc 5760
 atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtagt gcttcattca gctccggtc ccaacgatca 5820
 aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggctctccg 5880
 atcgttgta gaagtaagt ggcgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat 5940
 aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgettttctg tgactggtga gtactcaacc 6000
 aagtcattct gagaatagt tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg 6060
 gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgctca tcattggaaa acgttcttctg 6120
 gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcagatga acccactcgt 6180
 gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca 6240
 ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggaata agggcgacac ggaatggtg aatactcata 6300
 ctcttcttct tcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac 6360
 atatttgaat gtatttagaa aataaácaa ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa 6420
 gtgccacctg acgtc 6435

5 <210> 5
 <211> 6435
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia artificial
 <400> 5

ctgcctagcc ctctagacga tcgggcccac tggactccgc gcggccgaag cttatcggtc 60
 tcattggaaa aaaaaattaa aataaataa aataaaaact ctacctcaa ccgaggctag 120
 agggctaggg gataccagct gagagtcatg ttagacgaga ctacggcgta tcaattcgg 180
 catagacgag ggacgaacac acaacctcca gcgactcacc acgcgctcgt tttaaattcg 240

ES 2 432 357 T3

atgttggtcc gttccgaact ggctgttaac gtacttctta gacgaatccc aatccgcaaa 300
 acgcgacgaa gcgctacatg cccggctctat atgcgcaact gtaactaata actgatcaat 360
 aattatcatt agttaatgcc ccagtaatca agtatcgggt atatacctca aggcgcaatg 420
 tattgaatgc catttaccgg gcggaccgac tggcggggtg ctggggggcg gtaactgcag 480
 ttattactgc atacaagggt atcattgcgg ttatccctga aaggtaactg cagttacca 540
 cctcataaat gccatttgac ggggtgaaccg tcatgtagt cecatagtat acggttcatg 600
 cgggggataa ctgcagttac tgccatttac cgggcggacc gtaatacggg tcatgtactg 660
 gaataccctg aaaggatgaa ccgtcatgta gatgcataat cagtagcgat aatggtacca 720
 ctacgcaaaa accgctatgt agttaccgc acctatcgc aaactgagt ccctaaagg 780
 ttcagagggt gggttaactgc agttaccctc aaacaaaacc gtggttttag ttgccctgaa 840
 aggttttaca gcattgttga ggcggggtaa ctgcgtttac ccgccatccg cacatgccac 900
 cctccagata tattcgtctc gagagaccga ttgatctctt ggggtacgaa tgaccgaata 960
 gctttaatta tgctgagtga tatccctctg ggttcgaata gttgttcaaa catgtttttt 1020
 cgtccgacca tggtagcttc ggggtcaggt cgaagagaag gaggacgatg agaccgaggg 1080
 tctatggtg cctctttaac acaactgtgt cagaggctcg tgggacagaa acagaggtcc 1140
 cctttctcgg tgggagagga cgtcccggtc agtctcacia tegtcatga atcggaccat 1200
 ggttgctttt ggaccggtcc gaggttcga ggagtagata ctacgtaggt tgtcccgtg 1260
 accgtagggt cggccaagt caccgtcacc cagaccctgt ctgaagtgag agtggtagtc 1320
 gtcggatctc ggacttctaa aacgtcaaat aatgacagtc gtcgcatcgt tgaccggagg 1380
 ccgcgagtga aagccgcctc cctggttcca cctctagttt gcagccacc gacgtggtag 1440
 acagaagtag aagggcggtg gactactcgt caactttaga ccttgacgga gacaacacac 1500
 ggacgactta ttgaagatag ggtctctccg gtttcatgtc acctccacc tattgcggga 1560
 ggttagccca ttgagggtcc tctcacagt tctcgtcctg tcttctctgt cgtggatgtc 1620
 ggagtcgtcg tgggactgag actcgtttcg tctgatgctc tttgtgttc agatgcggac 1680
 gcttcagtgg gtagtcccgg actcagcggg gcagtgttcc tcgaagtgt cccctctcac 1740
 aatctgggtc gaaagaacat gtttcaccaa ctgatctcc cgggataaga tatcacagt 1800
 gatttacgat ctcgagcagc tagtcggagc tgacacggaa gatcaacggg cggtagacaa 1860
 caaacgggga gggggcacgg aaggaactgg gaccttcac ggtgagggtg acaggaaagg 1920
 attattttac tcctttaacg tagcgttaaca gactcatcca cagtaagata agacccccca 1980

ES 2 432 357 T3

ccccaccccg tccctgtcgtt cccctccta acccttctgt tctcgtccgt acgacccta 2040
cgccacccga gataccgaag actccgcctt tcttggtcga ccccgagatc ccccataggg 2100
gtgcgcggga catcgcgcg taattcgcgc cccccacacc accaatgcgc gtcgcactgg 2160
cgatgtgaa ggtcgcggga tcgcgggcga gaaagcgaa agaagggaag gaaagagcgg 2220
tgcaagcggc ccggagagtt ttttccttt ttttcgtacg tagagttaat cagtcggtgg 2280
tctcagggcg gggattgag cggttagggc ggggattgag gcgggtcaag gcgggtaaga 2340
ggcggggtac cgactgatta aaaaaataa atacgtctcc ggctccggcg gagccggaga 2400
ctcgataag tcttcacac tctccgaaa aaacctccg atccgaaaac gtttttcgaa 2460
ccccctgtc gagtcccgac gctaaagcgc ggttgaact gccgttagga tcgcacttcc 2520
gaccatccta aaataggggc gacggtagta ccaagctgg aacttgacgt agcagcggca 2580
cagggttta taccctaac cgttcttgc tctggatgg accggaggcg agtccttget 2640
caagttcatg aaggtttctt actggtgtg gagaagtcac cttccatttg tcttagacca 2700
ctaatacca tcttttga ccaagaggt aggactctt ttagctgaa atttctgtc 2760
ttaattatat caagagtcac ctcttgagtt tcttggtgg gctcctcag taaaagaacg 2820
gttttcaaac ctactacgga attctgaata acttgttggc cttaaccgtt catttcatct 2880
gtaccaaac tctcagctc cgtcaagaca aatggctctt cggacttag ttggtccgg 2940
ggagtctgag aaactctgt cctagtagt ccttaactt tcaactgtgca aaaagggct 3000
ttaactaac cctttatat ttgaagagg tcttatggg ccgcaggaga gactccagg 3060
cctcctttt ccgtagttca tattcaaact tcagatgctc tctttctga ttgtccttct 3120
acgaaagttc aagagacgag gggaggatt cgatacgtaa aaatattctg gtaccctgaa 3180
aacgaccgaa atctagacta gaaacactt cttggaatga agacaccaca ctgtattaac 3240
ctgtttgatg gatgtctcta aatttcgaga ttccattat attttaaaa ttcacatatt 3300
acacaatttg atgactaaga ttaacaaaca cataaaatct aaggttgat accttgacta 3360
cttaccctcg tcaccacctt acgaaatta ctcttttgg acaaacgag tcttctttac 3420
ggtagatcac tactactccg atgacgactg agagttgtaa gatgaggagg tttttcttc 3480
tctttccatc ttctggggtt cctgaaagga agtcttaacg attcaaaaa ctcagtacga 3540
cacaatcat tatcttgaga acgaacgaaa cgataaatgt ggtgtttcct ttttcgacgt 3600
gacgatagt tcttttaata cctttttata agacattgga aatattcatc cgtattgtca 3660
atattagrat tgtatgaaa aaaagaatga ggtgtgtccg tatctcacag acgataatta 3720
ttgataagag ttttaaacac atggaaatcg aaaaattaaa catttccca attattcctt 3780

ES 2 432 357 T3

ataaactaca tatcacggaa ctgatctcta gctagtatta gtcggtatgg tgtaaacatc 3840
tccaaaatga acgaaatfff ttggagggtg tggaggggga cttggacttt gtattttact 3900
tacgttaaca acaacaattg aacaaataac gtcgaatatt accaatgttt atttcggtat 3960
cgtagtgttt aaagtgttta tttcgtaaaa aaagtgcgct aagatcaaca ccaaacaggt 4020
ttgagtgtt acatagaata gtacagacct agccgacctt ctaggaggtc gcgcccctag 4080
agtacgacct caagaagcgg gtgggggtga acaataaacg tcgaatatta ccaatgttta 4140
tttcgttatc gtagtgttta aagtgtttat ttcgtaaaaa aagtgcgta agatcaacac 4200
caaacaggtt tgagtgtta catagaatag tacagacata tggcagctgg agatcgatct 4260
cgaaccgcat tagtaccagt atcgacaaag gacacacttt aacaataggc gagtgttaag 4320
gtgtgttga tgctcggcct togtattca catttcggac cccacggatt actcactcga 4380
ttgagtgtaa ttaacgcaac gcgagtgcg ggcgaaaggc cagccctttg gacagcacgg 4440
tcgacgtaat tacttagccg gttgcgcgcc cctctcggc aaacgcataa cccgcgagaa 4500
ggcgaaggag cgagtgcctg agcgacgcga gccagcaagc cgacgcgct cgccatagtc 4560
gagtgcgttt ccgccattat gccaataggc gtcttagtcc cctattgcgt cctttcttgt 4620
acactcgttt tccggtcgtt ttccggtcct tggcattttt ccggcgcac gaccgcaaaa 4680
aggtatccga ggcgggggga ctgctcgtag tgtttttagc tgcgagttca gtctccaccg 4740
ctttgggctg tcttgatatt tctatggtcc gcaaaggggg accttcgagg gagcacgcga 4800
gaggacaagg ctgggacggc gaatggccta tggacaggcg gaaagaggga agcccttcgc 4860
accgcgaaag agtatcgagt gcgacatcca tagagtcaag ccacatccag caagcgaggc 4920
tcgacccgac acacgtgctt ggggggcaag tcgggctggc gacgcggaat aggccattga 4980
tagcagaact caggttggc cattctgtgc tgaatagcgg tgaccgtcgt cggtgaccat 5040
tgtcctaate gtctcgtcct atacatccgc cagcatgtct caagaacttc accaccggat 5100
tgatgccgat gtgatcttcc ttgtcataaa ccatagacgc gagacgactt cggccaatgg 5160
aagccttttt ctcaaccate gagaactagg ccgtttggtt ggtggcgacc atcgccacca 5220
aaaaaaciaa cgttcgtcgt ctaatgcgcg tcttttttcc ctagagttct tctaggaaac 5280
tagaaaagat gccccagact gcgagtcacc ttgcttttga gtgcaattcc ctaaaaccag 5340
tactctaata gtttttccta gaagtggatc taggaaaatt taatttttac ttcaaaatct 5400
agttagattt catatatact catttgaacc agactgtcaa tggttacgaa ttagtcactc 5460
cgtggataga gtcgctagac agataaagca agtaggtacc aacggactga ggggcagcac 5520

ES 2 432 357 T3

```

atctattgat gctatgccct cccgaatggt agaccggggt caccgacgta ctatggcgct 5580
ctgggtgcga gtggccgagg tctaaatagt cgttatttgg tcggtcggcc ttcccggctc 5640
gcgtcttcac caggacggtg aaataggcgg aggtagggtca gataattaac aacggccctt 5700
cgatctcatt catcaagcgg tcaattatca aacgcggttc aacaacggta acgatgtccg 5760
tagcaccaca gtgcgagcag caaacctaac cgaagtaagt cgaggccaag ggttgctagt 5820
tccgctcaat gtactagggg gtacaacacg ttttttcgcc aatcgaggaa gccaggaggc 5880
tagcaacagt cttcattcaa ccggcgctac aatagtgagt accaataccg tcgtgacgta 5940
ttaagagaat gacagtacgg taggcattct acgaaaagac actgaccact catgagttgg 6000
ttcagtaaga ctcttatcac atacgccgct ggctcaacga gaacgggccc cagttatgcc 6060
ctattatggc gcggtgtatc gtcttgaaat tttcacgagt agtaaccttt tgcaagaagc 6120
cccgcctttg agagttccta gaatggcgac aactctaggt caagctacat tgggtgagca 6180
cgtgggttga ctagaagtcg tagaaaatga aagtggctgc aaagaccac tcgtttttgt 6240
ccttcgcttt tacggcgctt tttcccttat tcccgctgtg cctttacaac ttatgagtat 6300
gagaagggaa aagttataat aacttcgtaa atagtcccaa taacagagta ctgcctatg 6360
tataaactta cataaatctt tttatttgtt tatccccaag gcgcgtgtaa aggggccttt 6420
cacggtggac tgcag 6435

```

<210> 6
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia artificial

10

<400> 6

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1          5          10          15

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

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
          35          40          45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
          50          55          60

```

ES 2 432 357 T3

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
 100 105 110

Asn Trp Pro Pro Ala Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
 115 120 125

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

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

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

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

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

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220

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

<210> 7
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia artificial

<400> 7

atgaaacacc tgtggttctt cctcctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
 gtgcaactac agcagtgagg cgcaggactg ttgaagcctt cggagaccct gtcctcacc 120
 tgcgctgtct atggtgggtc cttcagtggt tactactgga gctggatagc ccagtcacca 180

ES 2 432 357 T3

gagaaggggc tggagtggat tggggaatc aatcatggtg gatacgtcac ctacaatccg 240
 tccctcgaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtt ctcctgaa 300
 ctgagctctg tgaccgccgc ggacacggct gtatattact gtgcgagggg ctatggctccg 360
 gggaaattatg actggctactt cgtctctctg ggccgtggca cctgggtcac tgtctcctca 420
 gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 480
 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtctg 540
 tggaaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagctctca 600
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 660
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 720
 aatctttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 780
 ccgtcagtct tctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcctgatctc ccggaccct 840
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 960
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctctcacc aggactggct gaatggcaag 1020
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080
 aaagccaaag ggagccccg agaaccacag gtgtacccc tgccccatc ccgggatgag 1140
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtaaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1260
 ctggactccg accgtctctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccaactacag 1380
 cagaaagacc tctccctgtc cccgggtaaa tga 1413

<210> 8
 <211> 1413
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia artificial

10

<400> 8

tactttgtgg acaccaagaa ggaggaggac caccgtcgag ggtctaccca ggacagggtc 60
 cacgttgatg tcgtcaccgc gcgtctgac aacttcggaa gcctctggga cagggagtgg 120
 acgcacagga taccaccag gaagtcacca atgatgacct cgacctatgc ggtcaggggt 180
 ctctcccccg acctcaccta accccttag ttagtaccac ctatgcagtg gatgttaggc 240

ES 2 432 357 T3

```

agggagctct cagctcagtg gtatagtcac ctgtgcaggt tcttggtaa gagggacttc 300
gactcgagac actggcggcg cctgtgccga catataatga cacgctccct gataccaggc 360
cccttaatac tgaccatgaa gctagagacc ccggcaccgt gggaccagtg acagaggagt 420
cggaggtggt tcccggtag ccagaagggg gaccgtggga ggaggttctc gtggagaccc 480
ccgtgtcgcc gggacccgac ggaccagttc ctgatgaagg ggcttggcca ctgccacagc 540
accttgagtc cgcgggactg gtcgccgac gtgtggaagg gccgacagga tgtcaggagt 600
cctgagatga gggagtcgtc gcaccactgg cacgggaggt cgtcgaacc ctgggtctgg 660
atgtagacgt tgcacttagt gttcgggtcg ttgtggttcc acctgttctc tcaactcggg 720
ttagaacac tgttttgagt gtgtacgggt ggcacgggtc gtggacttga ggacccccct 780
ggcagtcaga aggagaaggg gggttttggg ttctgtggg agtactagag ggcctgggga 840
ctccagtga cgcaccacca cctgcactcg gtgcttctgg gactccagtt caagttgacc 900
atgcacctgc cgcacctca cgtattacgg ttctgttctg gcgccctcct cgtcatgttg 960
tcgtgcatgg cacaccagtc gcaggagtgg caggacgtgg tcctgaccga cttaccgttc 1020
ctcatgttca cgttccagag gttgttctcg gagggtcggg ggtagctctt ttggtagagg 1080
tttcggttcc ccgtcggggc tcttgggtgc cacatgtggg acgggggtag ggcctactc 1140
gactggttct tggccagtc ggactggacg gaccagttc cgaagatagg gtcgctgtag 1200
cggcacctca ccctctcgtt acccgtcggc ctcttgttga tgttctggtg cggagggcac 1260
gacctgagtc tgcgaggaa gaaggagatg tcgttcgagt gccacctgtt ctctccacc 1320
gtcgtccccct tgcagaagag tacgagggcac tacgtactcc gagacgtgtt ggtgatgtgc 1380
gtctctcctg agagggacag gggcccattt act 1413

```

<210> 9
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Secuencia artificial

10

<400> 9

```

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp
1           5           10           15
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
                20           25           30

```

ES 2 432 357 T3

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe
 35 40 45
 Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95
 Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp
 115 120 125
 Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 225 230 235 240
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270

ES 2 432 357 T3

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal enteramente humano o una parte de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a 4-1BB, que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, en el que:
- 5 dicha región variable de cadena ligera comprende una CDR1 que consiste en los restos aminoacídicos 44-54 de SEC ID N°: 6, una CDR2 que consiste en los restos aminoacídicos 70-76 de SEC ID N°: 6, una CDR3 que consiste en los restos aminoacídicos 109-119 de SEC ID N°: 6; y
dicha región variable de cadena pesada comprende una CDR1 que consiste en los restos aminoacídicos 50-54 de SEC ID N°: 3, una CDR2 que consiste en los restos aminoacídicos 69-84 de SEC ID N°: 3 y una CDR3 que
10 consiste en los restos aminoacídicos 117-129 de SEC ID N°: 3.
2. El anticuerpo monoclonal enteramente humano o una parte de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1, en el que:
- 15 dicha cadena ligera comprende una región variable que consiste en los restos aminoacídicos 21-129 de SEC ID N°: 6; y dicha cadena pesada comprende una región variable que consiste en los restos aminoacídicos 20-140 de SEC ID N°: 3.
3. Un anticuerpo monoclonal enteramente humano que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que dicha cadena ligera comprende los restos aminoacídicos 21-236 de SEC ID N°: 6 y dicha cadena pesada comprende los restos aminoacídicos 20-467 de SEC ID N°: 3.
4. Una composición farmacéutica que comprende:
- 20 el anticuerpo monoclonal enteramente humano o una parte de unión a antígeno del mismo de la reivindicación 1 o 2; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5. Una composición farmacéutica que comprende:
- el anticuerpo monoclonal enteramente humano de la reivindicación 3; y
un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 6. El anticuerpo monoclonal enteramente humano o una parte de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de un cáncer.
7. Uso de un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de los restos aminoacídicos 20-467 de SEC ID N°: 3 y un polinucleótido aislado que comprende una
30 secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de los restos aminoacídicos 21-236 de SEC ID N°: 6 para producir un anticuerpo monoclonal enteramente humano o una parte de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
8. Uso de un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 1 y un polinucleótido que
35 comprende la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 4 para producir un anticuerpo monoclonal enteramente humano o una parte de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de cadena ligera codificada por la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 4 y una región variable de cadena pesada codificada por la secuencia de nucleótidos de SEC ID N°: 1.

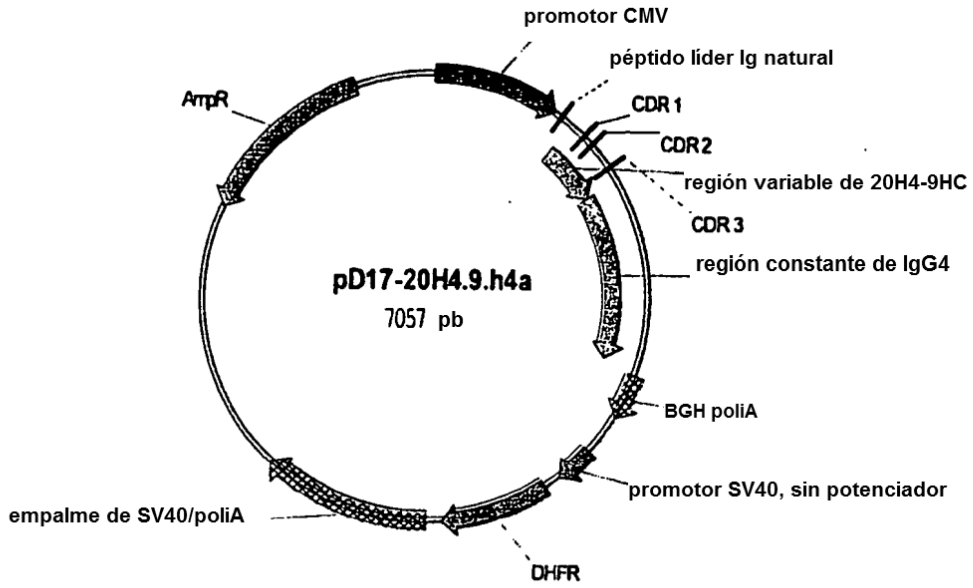


FIG. 1

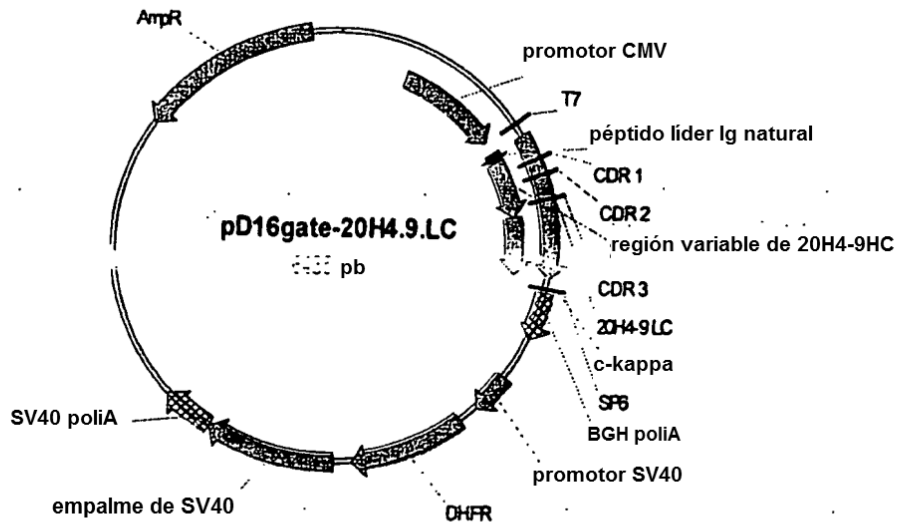


FIG. 2

```

1  CGATGTACGG GCCAGATATA CGCGTTGACA TTGATTATTG ACTAGTTATT
   GCTACATGCC CGGTCTATAT GCGCAACTGT AACTAATAAC TGATCAATAA
51  AATAGTAATC AATTACGGGG TCATTAGTTC ATAGCCCATA TATGGAGTTC
   TTATCATTAG TTAATGCCCC AGTAATCAAG TATCGGGTAT ATACCTCAAG
101 CGCGTTACAT AACTTACGGT AAATGGCCCC CCTGGCTGAC CGCCCAACGA
   GCGCAATGTA TTGAATGCCA TTTACCGGGC GGACCCACTG GCGGGTTGCT
151 CCCCCGCCCA TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTTCCCATA GTAACGCCAA
   GGGGGCGGGT AACTGCAGTT ATTACTGCAT ACAAGGGTAT CATTGCGGTT
201 TAGGGACTTT CCATTGACGT CAATGGGTGG ACTATTTACG GTAAACTGCC
   ATCCCTGAAA GGTAAGTCA GTTACCCACC TGATAAATGC CATTTGACGG
251 CACTTGGCAG TACATCAAGT GTATCATATG CCAAGTACGC CCCCTATTGA
   GTGAACCGTC ATGTAGTTCA CATAGTATAC GGTTTCATGCG GGGGATAACT
301 CGTCAATGAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCA TTATGCCCAG TACATGACCT
   GCAGTTACTG CCATTTACCG GCGCGACCGT AATACGGGTC ATGTACTGGA
351 TATGGGACTT TCCTACTTGG CAGTACATCT ACGTATTAGT CATCGCTATT
   ATACCCTGAA AGGATGAACC GTCATGTAGA TGCATAATCA GTAGCGATAA
401 ACCATGGTGA TCGGGTTTTG GCAGTACATC AATGGGCGTG GATAGCGGTT
   TGGTACCACT ACGCCAAAAC CGTCATGTAG TTACCCGCAC CTATCGCCAA
451 TGACTIONCGG GGATTTCCAA GTCTCCACCC CATTGACGTC AATGGGAGTT
   ACTGAGTGCC CCTAAAGGTT CAGAGGTGGG GTAAGTGCAG TTACCCTCAA
501 TGTTTTGGCA CCAAATCAA CGGGACTTTC CAAAATGTCG TAACACTIONC
   ACAAACCGT GGTTTTAGTT GCCCTGAAAG GTTTTACAGC ATTGTTGAGG
551 GCCCCATTGA CGCAAATGGG CGGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGTCTATAT
   CGGGGTAACT GCGTTTACCC GCCATCCGCA CATGCCACCC TCCAGATATA
601 AAGCAGAGCT CTCTGGCTAA CTAGAGAACC CACTGCTTAC TGGCTTATCG
   TTCGTCTCGA GAGACCGATT GATCTCTTGG GTGACGAATG ACCGAATAGC
                                     M K
651 AAATTAATAC GACTCACTAT AGGGAGACCC AAGCTTGGTA CCGCCATGAA
   TTTAATTATG CTGAGTGATA TCCCTCTGGG TTCGAACCAT GGCGGTACTT
   Péptido líder Ig natural
-----
· H L W F F L L L V A A P R W V L S ·
701 ACACCTGTGG TTCTTCTCC TCCTGGTGGC AGCTCCCAGA TGGGTCCTGT
   TGTGGACACC AAGAAGGAGG AGGACCACCG TCGAGGGTCT ACCCAGGACA
   natural Ig leader sequence
   ..
   Región variable de CP 20H4-9
-----
· Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E
751 CCCAGGTGCA ACTACAGCAG TGGGGCGCAG GACTGTTGAA GCCTTCGGAG
   GGTCCACGT TGATGTCGTC ACCCGCGTC CTGACAACTT CGGAAGCCTC
   CDR 1
   -----
   Región variable de CP 20H4-9
-----
T L S L T C A V Y G G S F S G Y Y ·
801 ACCCTGTCCC TCACCTGCGC TGTCTATGGT GGGTCTTCA GTGGTTACTA
   TGGGACAGGG AGTGGACGCG ACAGATACCA CCCAGGAAGT CACCAATGAT
   CDR 1 CDR 2
-----
   Región variable de CP 20H4-9
-----
· W S W I R Q S P E K G L E W I G E ·
851 CTGGAGCTGG ATACGCCAGT CCCCAGAGAA GGGGCTGGAG TGGATTGGGG
   GACCTCGACC TATGCGGTCA GGGGTCTT CCCCAGACCTC ACCTAACCC

```

FIG. 3A

CDR 2

 Región variable de CP 20H4-9

901 · I N H G G Y V T Y N P S L E S R
 AAATCAATCA TGGTGGATAC GTCACCTACA ATCCGTCCCT CGAGAGTCGA
 TTTAGTTAGT ACCACCTATG CAGTGGATGT TAGGCAGGGA GCTCTCAGCT
 Región variable de CP 20H4-9

951 V T I S V D T S K N Q F S L K L S
 GTCACCATAT CAGTAGACAC GTCCAAGAAC CAGTTCTCCC TGAAGCTGAG
 CAGTGGTATA GTCATCTGTG CAGGTTCTTG GTCAAGAGGG ACTTCGACTC
 CDR 3

Región variable de CP 20H4-9

1001 · S V T A A D T A V Y Y C A R D Y G
 CTCTGTGACC GCCGCGGACA CGGCTGTATA TTA CTGTGCG AGGGACTATG
 GAGACTG GCGGCCTGT GCCACATAT AATGACACGC TCCCTGATAC
 CDR 3

Región variable de CP 20H4-9

1051 · P G N Y D W Y F D L W G R G T L
 GTCCGGGGAA TTATGACTGG TACTTCGATC TCTGGGGCCG TGGCACCTG
 CAGGCCCTT AATACTGACC ATGAAGCTAG AGACCCCGGC ACCGTGGGAC
 Dominio CH1 de IgG4

Región variable de CP 20H4-9

1101 V T V S S A S T K G P S V F P L A
 GTCACTGTCT CCTCAGCTAG CACCAAGGGC CCATCCGTCT TCCCCTGGC
 CAGTGACAGA GGAGTCGATC GTGGTTCCCG GGTAGGCAGA AGGGGGACCG
 Dominio CH1 de IgG4

1151 · P C S R S T S E S T A A L G C L
 GCCCTGTCC AGGAGCACT CCGAGAGCAC AGCCGCCCTG GGCTGCCTGG
 CGGGACGAGG TCTCGTGGA GGCTCTCGTG TCGGCGGGAC CCGACGGACC
 Dominio CH1 de IgG4

1201 · K D Y F P E P V T V S W N S G A
 TCAAGGACTA CTTCCCGAA CCGGTGACGG TGTCGTGGAA CTCAGGCGCC
 AGTTCCTGAT GAAGGGGCTT GGCCACTGCC ACAGCACCTT GAGTCCGCGG
 Dominio CH1 de IgG4

1251 L T S G V H T F P A V L Q S S G L
 CTGACCAGCG GCGTGACAC CTTCCCGGCT GTCCTACAGT CCTCAGGACT
 GACTGGTCCG CGCACGTGTG GAAGGGCCGA CAGGATGTCA GGAGTCTGA
 Dominio CH1 de IgG4

1301 · Y S L S S V V T V P S S S L G T K
 CTACTCCCTC AGCAGCGTGG TGACCGTGCC CTCCAGCAGC TTGGGCACGA
 GATGAGGGAG TCGTCGCACC ACTGGCACGG GAGGTCGTCG AACCCGTGCT

FIG. 3B

Dominio CH1 de IgG4

 · T Y T C N V D H K P S N T K V D
 1351 AGACCTACAC CTGCAACGTA GATCACAAGC CCAGCAACAC CAAGGTGGAC
 TCTGGATGTG GACGTTGCAT CTAGTGTTCG GGTCGTGTG GTTCCACCTG
 Región bisagra de IgG4

Dominio CH1 de IgG4

 K R V E S K Y G P P C P P C P A P ·
 1401 AAGAGAGTTG AGTCAAATA TGGTCCACCT TGCCCACCTT GCCCAGCACC
 TTCTCTCAAC TCAGGTTTAT ACCAGGTGGA ACGGGTGGAA CGGGTCGTGG
 Dominio CH2 de IgG4

· E F L G G P S V F L F P P K P K D ·
 1451 TGAGTTCCTG GGGGACCAT CAGTCTTCTT GTCCCCCA AAACCCAAGG
 ACTCAAGGAC CCCCTGGTA GTCAGAAGGA CAAGGGGGT TTTGGGTTCC
 Dominio CH2 de IgG4

· T L M I S R T P E V T C V V V D
 1501 ACACTCTCAT GATCTCCCG ACCCTGAGG TCACGTGCGT GGTGGTGGAC
 TGTGAGAGTA CTAGAGGGCC TGGGGACTCC AGTGCACGCA CCACCACCTG
 Dominio CH2 de IgG4

V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V ·
 1551 GTGAGCCAGG AAGACCCCGA GGTCCAGTTC AACTGGTACG TGGATGGCGT
 CACTCGGTCC TTCTGGGGCT CCAGGTCAAG TTGACCATGC ACCTACCSCA
 Dominio CH2 de IgG4

· E V H N A K T K P R E E Q F N S T ·
 1601 GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TTCAACAGCA
 CCTCCACGTA TTACGGTCTT GTTTCGGCGC CCTCCTCGTC AAGTTGTCTG
 Dominio CH2 de IgG4

· Y R V V S V L T V L H Q D W L N
 1651 GGTACCGTGT GGTCCGGTTC CTCACCGTCC TGCACGAGGA CTGGCTGAAC
 GCATGGCACA CCAGTCGCAG GAGTGGCAGG ACGTGGTCTT GACCGACTGT
 Dominio CH2 de IgG4

G K E Y K C K V S N K G L P S S I ·
 1701 GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGGCCTCC CGTCCTCCAT
 CCGTTCCTCA TGTTACGTT CCAGAGGTTG TTTCCGGAGG GCAGGAGGTA
 Dominio CH3 de IgG4

Dominio CH2 de IgG4

 · E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y ·
 1751 CGAGAAAACC ATCTCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAG CCACAGGTGT
 GCTCTTTTGG TAGAGTTTC GGTTCCTCGT CGGGGTCTC GGTGTCCACA
 Dominio CH3 de IgG4

· T L P P S Q E E M T K N Q V S L
 1801 ACACCCTGCC CCCATCCCAG GAGGAGATGA CCAAGAACCA GGTCAGCCTG
 TGTGGGACGG GGGTAGGGTC CTCCTCTACT GGTCTTGGT CCAGTCGGAC

FIG. 3C

Dominio CH3 de IgG4

 T C L V K G F Y P S D I A V E W E
 1851 ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTACCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA
 TGGACGGACC AGTTTCCGAA GATGGGGTGC CTGTAGCGGC ACCTCACCTT

Dominio CH3 de IgG4

 S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
 1901 GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGCTGG
 CTCGTTACCC GTCGGCCTCT TGTTGATGTT CTGGTGC GGA GGGCACGACC

Dominio CH3 de IgG4

 S D G S F F L Y S R L T V D K S
 1951 ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA GGCTAACCGT GGACAAGAGC
 TGAGGCTGCC GAGGAAGAAG GAGATGTCGT CCGATTGGCA CCTGTTCTCG

Dominio CH3 de IgG4

 R W Q E G N V F S C S V M H E A L
 2001 AGGTGGCAGG AGGGGAATGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC ATGAGGCTCT
 TCCACCGTCC TCCCCTTACA GAAGAGTACG AGGCACTACG TACTCCGAGA

Dominio CH3 de IgG4

 H N H Y T Q K S L S L S L G K
 2051 GCACAACCAC TACACACAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCTG GGTAATGAT
 CGTGTGGTG ATGTGTGTCT TCTCGGAGAG GGACAGAGAC CCATTTACTA
 2101 CTAGAGGGCC CTATTCTATA GTGTCACCTA AATGCTAGAG CTCGCTGATC
 GATCTCCCGG GATAAGATAT CACAGTGGAT TTACGATCTC GAGCGACTAG
 2151 AGCCTCGACT GTGCCTTCTA GTTGCCAGCC ATCTGTTGTT TGCCCTCCC
 TCGGAGCTGA CACGGAAGAT CAACGGTCCG TAGACAACAA ACGGGGAGGG
 2201 CCGTGCCTTC CTTGACCCTG GAAGGTGCCA CTCCCCTGT CTTTCTTAA
 GGCACGGAAG GAACTGGGAC CTTCCACGGT GAGGGTGACA GGAAAGGATT
 2251 TAAATGAGG AAATGTCATC GCATTGTCTG AGTAGGTGTC ATTCTATTCT
 ATTTTACTCC TTTAACGTAG CGTAACAGAC TCATCCACAG TAAGATAAGA
 2301 GGGGGTGGG GTGGGGCAGG ACAGCAAGGG GGAGGATTGG GAAGACAATA
 CCCCCACCC CACCCCTCC TGTGTTCCC CCTCCTAAC CTTCTGTTAT
 2351 CGAGGCATGC TGGGGATGCG GTGGCTCTA TGGCTTCTGA GCGGGAAGA
 CGTCCGATCG ACCCTACGC CACCCGAGAT ACCGAAACT CCGCCTTCT
 2401 ACCAGCTGGG GCTCTAGGGG GTATCCCAC GCGCCTGTA GCGCGCATT
 TGGTCCGACC CGAGATCCCC CATAGGGGTG CCGGGGACAT CGCCGCGTAA
 2451 AAGCGCGGCG GGTGTGGTGG TTACGCGCAG CGTGACCGCT AACTTGCCA
 TTCGCGCCGC CCACACCACC AATGCGCGTC GCACTGGCGA TGTGAACGGT
 2501 GCGCCCTAGC GCCCGCTCCT TTCGTTTCT TCCCTTCTT TCTCGCCACG
 CGCGGGATCG CGGGCGAGGA AAGCGAAAGA AGGGAAGGAA AGAGCGGTGC
 2551 TTCGCCGGGC CTCTCAAAAA AGGGAAAAAA AGCATGCATC TCAATTAGTC
 AAGCGGCCCG GAGAGTTTTT TCCCTTTTTT TCGTACGTAG AGTTAATCAG
 2601 AGCAACCA TA GTCCCGCCCC TAACTCCGCC CATCCCGCCC TAACTCCGC
 TCGTTGGTAT CAGGGCGGGG ATTGAGGCGG GTAGGGCGGG GATTGAGGCG
 2651 CCAGTTCCGC CCATTCTCCG CCCCATGGCT GACTAATTTT TTTTATTTAT
 GGTCAAGGCG GGTAAGAGGC GGGGTACCGA CTGATTAAAA AAAATAAATA
 2701 GCAGAGGCCG AGGCCGCTC GGCCTCTGAG CTATTCCAGA AGTAGTGAGG
 CGTCTCCGGC TCCGGCGGAG CCGGAGACTC GATAAGGTCT TCATCACTCC
 2751 AGGCTTTTTT GGAGGCCTAG GCTTTTGCAA AAAGCTTGGG CAGCTCAGGG
 TCCGAAAAAA CCTCCGGATC CGAAAACGTT TTTCGAACCT GTCGAGTCCC
 2801 CTGCGATTTT GCGCCAAACT TGACGGCAAT CCTAGCGTGA AGGCTGGTAG
 GACGCTAAAG CGCGGTTTGA ACTGCCGTTA GGATCGCACT TCCGACCATC

FIG. 3D

2851 GATTTTATCC CCGCTGCCAT CATGGTTCGA CCATTGAACT GCATCGTCCG
 CTAAAATAGG GGCGACGGTA GTACCAAGCT GGTAACCTGA CGTAGCAGCG
 2901 CGTGTCCCAA AATATGGGGA TTGGCAAGAA CGGAGACCTA CCCTGGCCTC
 GCACAGGGTT TTATACCCCT AACCGTTCCT GCCTCTGGAT GGGACCGGAG
 2951 CGCTCAGGAA CGAGTTC AAGTTCACAA GAATGACCAC AACCTCTTCA
 GCGAGTCCTT GCTCAAGTTC ATGAAGGTTT CTTACTGGTG TTGGAGAAGT
 3001 GTGGAAGGTA AACAGAATCT GGTGATTATG GGTAGGAAAA CCTGGTTCTC
 CACCTTCCAT TTGTCTTAGA CCACTAATAC CCATCCTTTT GGACCAAGAG
 3051 CATTCTGAG AAGAATCGAC CTTTAAAGGA CAGAATTAAT ATAGTTCTCA
 GTAAGGACTC TTCTTAGCTG GAAATTTCCCT GTCTTAATTA TATCAAGAGT
 3101 GTAGAGAACT CAAAGAACCA CCACGAGGAG CTCATTTTCT TGCCAAAAGT
 CATCTCTTGA GTTCTTTGGT GGTGCTCCTC GAGTAAAAGA ACGGTTTTCA
 3151 TTGGATGATG CCTTAAGACT TATTGAACAA CCGGAATTGG CAAGTAAAGT
 AACCTACTAC GGAATTCCTG ATAACCTGTT GGCCTTAACC GTTCTTCA
 3201 AGACATGGTT TGGATAGTCG GAGGCAGTTC TGTTTACCAG GAAGCCATGA
 TCTGTACCAA ACCTATCAGC CTCCGTCAAG ACAAATGGTC CTTCCGGTACT
 3251 ATCAACCAGG CCACCTTAGA CTCTTTGTGA CAAGGATCAT GCAGGAATTT
 TAGTTGGTCC GGTGGAATCT GAGAAACACT GTTCCTAGTA CGTCCTTAAA
 3301 GAAAGTGACA CGTTTTCCC AGAAATGAT TTGGGGAAAT ATAAACTTCT
 CTTTCACTGT GCAAAAAGGG TCTTTAACTA AACCCCTTA TATTTGAAGA
 3351 CCCAGAATAC CCAGGCGTCC TCTCTGAGGT CCAGGAGGAA AAAGGCATCA
 GGGTCTTATG GGTCGCGAGG AGAGACTCCA GGTCCCTCCT TTTCCGTAGT
 3401 AGTATAAGTT TGAAGTCTAC GAGAAGAAAG ACTAACAGGA AGATGCTTTC
 TCATATTCAA ACTTCAGATG CTCTTCTTTC TGATTGTCTT TCTACGAAAG
 3451 AAGTTCTCTG CTCCCTCCT AAAGCTATGC ATTTTTATAA GACCATGGGA
 TTCAAGAGAC GAGGGGAGGA TTTCGATACG TAAAAATATT CTGTACCCTT
 3501 CTTTGTGCTG CTTTAGATCT CTTTGTGAAG GAACCTTACT TCTGTGGTGT
 GAAAACGACC GAAATCTAGA GAAACACTTC CTTGGAATGA AGACACCACA
 3551 GACATAATTG GACAAACTAC CTACAGAGAT TTAAAGCTCT AAGGTAATA
 CTGTATTAAC CTGTTTGATG GATGCTCTA AATTTCGAGA TTCCATTTAT
 3601 TAAAATTTTT AAGTGTATAA TGTGTTAAAC TACTGATTCT AATTGTTTGT
 ATTTTTAAAA TTCACATATT ACACAATTTG ATGACTAAGA TTAACAAACA
 3651 GTATTTTAGA TTCCAACCTA TGGAACTGAT GAATGGGAGC AGTGGTGGAA
 CATAAAATCT AAGGTTGGAT ACCTTGACTA CTTACCCTCG TCACCACCTT
 3701 TGCCTTAAT GAGGAAAACC TGTTTTGCTC AGAAGAAATG CCATCTAGTG
 ACGGAAATTA CTCCTTTTGG ACAAACGAGC TCTTCTTAC CTGATGATC
 3751 ATGATGAGGC TACTGCTGAC TCACAACATT CTACTCCTCC AAAAAAGAAG
 TACTACTCCG ATGACGACTG AGAGTTGTAA GATGAGGAGG TTTTTCTTC
 3801 AGAAAGGTAG AAGACCCCAA GGACTTTCCT TCAGAATTGC TAAGTTTTTT
 TCTTTCCATC TTCTGGGGTT CCTGAAAGGA AGTCTTAACG ATTCAAAAAA
 3851 GAGTCATGCT GTGTTTAGTA ATAGAATCTT TGCTTGCTTT GCTATTTACA
 CTCAGTACGA CACAAATCAT TATCTTGAGA ACGAACGAAA CGATAAATGT
 3901 CCACAAAGGA AAAAGCTGCA CTGCTATACA AGAAAATTAT GGAAAAATAT
 GGTGTTTCCCT TTTTCGACGT GACGATATGT TCTTTAATA CCTTTTATA
 3951 TCTGTAACCT TTATAAGTAG GCATAACAGT TATAATCATA ACATACTGTT
 AGACATTGGA AATATTCATC CGTATTGTCA ATATTAGTAT TGTATGACAA
 4001 TTTTCTTACT CCACACAGGC ATAGAGTGTC TGCTATTAAT AACTATGCTC
 AAAAGAATGA GGTGTGTCG TATCTCACAG ACGATAATTA TTGATACGAG
 4051 AAAAATTGTG TACCTTTAGC TTTTAAATTT GTAAAGGGGT TAATAAGGAA
 TTTTAAACAC ATGGAATCG AAAAATTTAA CATTTCCCCA ATTATTCCTT
 4101 TATTTGATGT ATAGTGCCTT GACTAGAGAT CATAATCAGC CATACCACAT
 ATAACTACA TATCACGGA CTGATCTCTA GTATTAGTCG GTATTGGTA
 4151 TTGTAGAGGT TTTACTTACT TTAATAAACC TCCCACACCT CCCCTGAAC
 AACATCTCCA AAATGAAAGC AATTTTTTGG AGGGTGTGGA GGGGACTTG
 4201 CTGAAACATA AAATGAATGC AATTGTTGTT GTTAACTTGT TTATTGCAGC

FIG. 3E

```

GACTTTGTAT TTTACTTACG TTAACAACAA CAATTGAACA AATAACGTCG
4251 TTATAATGGT TACAAATAAA GCAATAGCAT CACAAATTTT ACAAATAAAG
AATATTACCA ATGTTTATTT CGTTATCGTA GTGTTTAAAG TGTTTATTTT
4301 CTTTTTTTTC ACTGCATTCT AGTTGTGGTT TGTCAAACT CATCAATGTA
GTAAAAAAG TGACGTAAGA TCAACACCAA ACAGGTTTGA GTAGTTACAT
4351 TCTTATCATG TCTGGATCGG CTGGATGATC CTCCAGCGCG GGGATCTCAT
AGAATAGTAC AGACCTAGCC GACCTACTAG GAGGTCGCG CCCTAGAGTA
4401 GCTGGAGTTC TTCGCCACC CCAACTGTGT TATTGCAGCT TATAATGGTT
CGACCTCAAG AAGCGGGTGG GGTGGAACAA ATAACGTCGA ATATTACCAA
4451 ACAAATAAAG CAATAGCATC ACAAATTTCA CAAATAAAGC ATTTTTTTTCA
TGTTTATTTT GTTATCGTAG TGTTTAAAGT GTTATTTTCG TAAAAAAGT
4501 CTGCATTCTA GTTGTGGTTT GTCCAAACTC ATCAATGTAT CTTATCATGT
GACGTAAGAT CAACACAAA CAGGTTTGGAG TAGTTACATA GAATAGTACA
4551 CTGTATACCG TCGACCTCTA GCTAGAGCTT GCGGTAATCA TCCGATAGC
GACATATGGC AGCTGGAGAT CGATCTCGAA CCGCATTAGT AGCAGTATCG
4601 TGTTTCCTGT GTGAAATTGT TATCCGCTCA CAATTCCACA CAACATACGA
ACAAAGGACA CACTTTAACA ATAGCGGAGT GTAAGGTGT GTTGTATGCT
4651 GCCGGAAGCA TAAAGTGTA AGCCTGGGGT GCCTAATGAG TGAGCTAACT
CGGCCTTCGT ATTCACATT TCGGACCCCA CGGATTACTC ACTCGATTGA
4701 CACATTAATT GCGTTGCGCT CACTGCCCGC TTCCAGTCG GGAACCTGT
GTGTAATTAA CGCAACGCGA GTGACGGGCG AAAGGTCAGC CCTTTGGACA
4751 CGTGCCAGCT GCATTAATGA ATCGGCCAAC GCGCGGGGAG AGGCGGTTT
GCACGGTCGA CGTAATTACT TAGCCGGTTG CGCGCCCTC TCCGCCAAC
4801 CGTATPGGG GCTCTTCCGC TTCTCGCTC ACTGACTCGC TGCGCTCGGT
GCATAACCCG CGAGAAGGCG AAGGAGCGAG TGACTGAGCG ACGCGAGCCA
4851 CGTTCGGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT
GCAAGCCGAC GCCGCTCGCC ATAGTCGAGT GAGTTTCCGC CATTATGCCA
4901 TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACCGAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC
ATAGGTGTCT TAGTCCCCTA TTGCGTCTT TCTTGTACAC TCGTTTTCCG
4951 CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA
GTCGTTTTCC GGTCTTGGC ATTTTTCCGG CGCAACGACC GCAAAAAGGT
5001 TAGGTCGCG CCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA
ATCCGAGGCG GGGGACTGC TCGTAGTGT TTTAGCTCG AGTTCAGTCT
5051 GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
CCACCGCTT GGGCTGTCT GATATTTCTA TGGTCCGCA AGGGGACCT
5101 AGCTCCCTCG TCGCTCTCC TGTTCGCGC GTGCGCTTA CCGGATACCT
TCGAGGGAGC ACGCGAGAGG ACAAGGCTGG GACGGCGAAT GGCCTATGGA
5151 GTCCGCCTT CTCCCTCGG GAAGCGTGGC GCTTCTCAA TGCTACGCT
CAGGCGGAAA GAGGGAAGCC CTTGCGACCG CGAAAGAGTT ACGAGTGCGA
5201 GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTT GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG
CATCCATAGA GTCAAGCCAC ATCCAGCAAG CGAGGTTCTGA CCCGACACAC
5251 CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACATATCG
GTGCTTGGGG GGCAAGTCGG GCTGGCGACG CGGAATAGGC CATTGATAGC
5301 TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA
AGAACTCAGG TTGGGCATT CTGTGCTGAA TAGCGGTGAC CGTCGTCGGT
5351 CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
GACCATTGTC CTAATCGTCT CGCTCCATAC ATCCGCCACG ATGTCTCAAG
5401 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT
AACTTACCA CCGGATTGAT GCCGATGTGA TCTTCTGTC ATAAACCATA
5451 CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT
GACGCGAGAC GACTTCGGTC AATGGAAGCC TTTTCTCAA CCATCGAGAA
5501 GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTT TTTTGGCAAG
CTAGGCCGTT TGTTTGGTGG CGACCATCGC CACCAAAAA ACATACGTTT
5551 CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGTCTT
GTCGTCTAAT GCGCTCTTT TTTTCTAGA GTTCTCTAG GAAACTAGAA

```

FIG. 3F

5601 TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AACTCACGT TAAGGGATTT
AAGATGCCCC AGACTGCGAG TCACCTTGCT TTTGAGTGCA ATTCCCTAAA
5651 TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTA
ACCAGTACTC TAATAGTTTT TCCTAGAAGT GGATCTAGGA AAATTTAATT
5701 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA
TTTACTTCAA AATTTAGTTA GATTCATAT ATACTCATTT GAACCAGACT
5751 CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGC ATCTGTCTAT
GTC AATGGTT ACGAATTAGT CACTCCGTGG ATAGAGTCGC TAGACAGATA
5801 TTCGTTCATC CATAGTTGCC TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA
AAGCAAGTAG GTATCAACGG ACTGAGGGGC AGCACATCTA TTGATGCTAT
5851 CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC
GCCCTCCCGA ATGGTAGACC GGGGTCACGA CGTACTATG GCGCTCTGGG
5901 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG
TGCGAGTGGC CGAGGTCTAA ATAGTCGTTA TTTGGTCGGT CCGCCTTCCC
5951 CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGCTTATT
GGCTCGCGTC TTCACCAGGA CGTTGAAATA GGCGGAGGTA GGTCAGATAA
6001 AATTGTTGCC GGGAAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGGC
TTAACAACGG CCTTCGATC TCATTCATCA AGCGGTCAAT TATCAAACGC
6051 CAACGTTGTT GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG
GTTGCAACAA CGGTAACGAT GTCCGTAGCA CCACAGTGGC AGCAGCAAAC
6101 GTATGGCTTC ATTCAGTCC GGTTCCEAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA
CATACCGAAG TAAGTCGAGG CCAAGGGTTG CTAGTTCCGC TCAATGTA
6151 TCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT
AGGGGGTACA ACACGTTTTT TCGCCAATCG AGGAAGCCAG GAGGCTAGCA
6201 TGTCAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC
ACAGTCTTCA TTCAACCGGC GTCACAATAG TGAGTACCAA TACCCTCGTG
6251 TGCATAATTC TCTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
ACGTATTAAG AGAATGACAG TACGGTAGGC ATTCTACGAA AAGACACTGA
6301 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG
CCTCATGA GTTGGTTCAG TAAGACTCTT ATCACATACG CCGCTGGCTC
6351 TTGCTCTTGC CCGCGCTCAA TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA
AACGAGAACC GGCCGCAGTT ATGCCCTATT ATGGCGCGGT GTATCGTCTT
6401 CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTCCGGGCG AAAACTCTCA
GAAATTTTCA CGAGTAGTAA CCTTTTGCAA GAAGCCCCGC TTTGAGAGT
6451 AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC
TCCTAGAATG GCGACAATC TAGGTCAAGC TACATTGGGT GAGGACTCTG
6501 CCACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTCAC CAGCGTTTCT GGGTGAACAA
GTTGACTAGA AGTCGTAGAA AATGAAAGTG GTCGCAAAGA CCCACTCGTT
6551 AACACGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
TTTGTCCCTC CGTTTTACGG CGTTTTTTCC CTTATTCCCG CTGTGCCTTT
6601 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA
ACAACCTATG AGTATGAGAA GGAAAAGTT ATAATAACTT CGTAAATAGT
6651 GGGTTATTGT CTCATGACG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA
CCCAATAACA GAGTACTCGC CTATGTATAA ACTTACATAA ATCTTTTTAT
6701 AACAAATAGG GGTCCCGGC ACATTTCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC
TTGTTTATCC CCAAGGCGCG TGTAAGGGG CTTTTCACGG TGGACTGCAG
6751 GACGGATCGG GAGATCTGCT AGGTGACCTG AGGCGCGCGG GCTTCGAATA
CTGCCTAGCC CTCTAGACGA TCCACTGGAC TCCGCGCGGC CGAAGCTTAT
6801 GCCAGAGTAA CCTTTTTTTT TAATTTTATT TTATTTTATT TTTGAGATGG
CGGTCTCATT GGAAAAAAA ATTAAAATAA AATAAAAATA AACTCTACC
6851 AGTTTGGCGC CGATCTCCCG ATCCCTATG GTCGACTCTC AGTACAATCT
TCAAACCGCG GCTAGAGGC TAGGGGATAC CAGCTGAGAG TCATGTTAGA
6901 GCTCTGATGC CGCATAGTTA AGCCAGTATC TGCTCCCTGC TTGTGTGTTG
CGAGACTACG GCGTATCAAT TCGGTCATAG ACGAGGGACG AACACACAAC
6951 GAGGTCGCTG AGTAGTGCGC GAGCAAAATT TAAGCTACAA CAAGCAAGG

FIG. 3G

CTCCAGCGAC TCATCACGCG CTCGTTTAA ATTCGATGTT GTCCGTTCC
7001 CTTGACCGAC AATTGCATGA AGAATCTGCT TAGGGTTAGG CGTTTTGCGC
GAACTGGCTG TTAACGTACT TCTTAGACGA ATCCCAATCC GCAAAACGCG
7051 TGCTTCG
ACGAAGC

FIG. 3H

```

1   GACGGATCGG GAGATCTGCT AGCCCGGGTG ACCTGAGGCG CGCCGGCTTC
   CTGCCTAGCC CTCTAGACGA TCGGGCCAC TGGACTCCGC GCGCCGAAG
51  GAATAGCCAG AGTAACCTTT TTTTAAATT TTATTTTATT TTATTTTGA
   CTTATCGGTC TCATTGGAAA AAAAAATTA AATAAAATA AATAAAACT
101 GATGGAGTT  GGCGCCGATC TCCCGATCCC CTATGGTCGA CTCTCAGTAC
   CTACCTCAA  CCGCGGCTAG AGGGCTAGGG GATACCAGCT GAGAGTCATG
151 AATCTGCTCT GATGCCGCAT AGTTAAGCCA GTATCTGCTC CCTGCTTG TG
   TTAGACGAGA CTACGGCGTA TCAATTCGGT CATAGACGAG GGACGAACAC
201 TGTTGGAGGT CGCTGAGTAG TGCGCGAGCA AAATTTAAGC TACAACAAGG
   ACAACCTCCA GCGACTCATC ACGCGCTCGT TTTAAATTCG ATGTTGTTCC
251 CAAGGCTTGA CCGACAATTG CATGAAGAA  CTGCTTAGGG TTAGCGGTTT
   GTTCCGAAC  GGCTGTTAAC GTACTTCTTA GACGAATCCC AATCCGCAA
301 TGCGCTGCTT CCGGATGTAC GGGCCAGATA TACGCGTTGA CATTGATTAT
   ACGCGACGAA GCGCTACATG CCCGGTCTAT ATGCGCAACT GTAACATA
351 TGACTAGTTA TTAATAGTAA TCAATTACGG GGTCAATAGT TCATAGCCCA
   ACTGATCAAT AATTATCATT AGTTAATGCC CCAGTAATCA AGTATCGGGT
401 TATATGGAGT TCCGCGTTAC ATAACTACG  GTAATGGCC CGCCTGGCTG
   ATATACCTCA AGGCGCAATG TATTGAATGC CATTACCGG GCGGACCGAC
451 ACCGCCCAAC GACCCCGCC  CATTGACGTC AATAATGACG TATGTTCCCA
   TGGCGGGTTG CTGGGGGCGG GTAACTGCAG TTATTACTGC ATACAAGGGT
501 TAGTAACGCC AATAGGGACT TTCCATTGAC  GTCAATGGGT GGAGATTTA
   ATCATTGCGG TTATCCCTGA AAGGTAAGT  CAGTTACCCA CCTCATAAAT
551 CGGTAAACTG CCCACTTGGC AGTACATCAA GTGTATCATA TGCCAAGTAC
   GCCATTTGAC GGGTGAACCG TCATGTAGTT CACATAGTAT ACGGTTTATG
601 GCCCCCTATT GACGTCAATG ACGGTAATG  GCCCGCTGG CATTATGCCC
   CGGGGGATAA CTGCAGTTAC TGCCATTTAC CGGGCGGACC GTAATACGGG
651 AGTACATGAC CTTATGGGAC TTTCTACTT  GGCAGTACAT CTACGTATTA
   TCATGTACTG GAATACCCTG AAAGGATGAA CCGTCATGTA GATGCATAAT
701 GTCATCGCTA TTACCATGGT GATGCGGTTT TGGCAGTACA TCAATGGGCG
   CAGTAGCGAT AATGGTACCA CTACGCCAAA ACCGTCATGT AGTTACCCGC
751 TGGATAGCGG TTTGACTCAC GGGGATTTCC AAGTCTCCAC CCCATTGACG
   ACCTATCGCC AACTGAGTG CCCCTAAAGG TTCAGAGGTG GGGTAACTGC
801 TCAATGGGAG TTTGTTTTGG CACCAAATC  AACGGGACTT TCCAAAATGT
   AGTTACCCTC AAACAAAACC GTGGTTTTAG TTGCCCTGAA AGGTTTTACA
851 CGTAACAAC  CCGCCCCATT GACGCAAATG GCGGGTAGGC GTGTACGGTG
   GCATTGTTGA GCGGGGTAA  CTGCGTTTAC CCGCCATCCG CACATGCCAC
901 GGAGTCTAT  ATAGCGAGG CTCTCTGGCT AACTAGAGAA CCGACTGCTT
   CCTCCAGATA TATTCGTCTC GAGAGACCGA TTGATCTCTT GGGTGACGAA
951 ACTGGCTTAT CGAAATTAAT ACGACTCACT ATAGGGAGAC CCAAGCTTAT
   TGACCGAATA GCTTTAATTA TGCTGAGTGA TATCCCTCTG GGTTCGAATA
                                     péptido líder Ig natural
                                     -----
                                     M E A P A Q
1001 CAACAAGTTT GTACAAAAA GCAGGCTGGT ACCATGGAAG CCCCAGCTCA
      GTTGTTCAAA CATGTTTTTT CGTCCGACCA TGGTACCTTC GGGGTCGAGT
                                     péptido líder Ig natural
                                     -----
      · L L F L L L L W L P D T T G E I V ·
1051 GCTTCTTTC CTCCTGCTAC TCTGGCTCCC AGATACCACC GGAGAAATTG
      CGAAGAGAAG GAGGACGATG AGACCGAGGG TCTATGGTGG CCTCTTTAAC

```

FIG. 4A

ES 2 432 357 T3

Región variable de CL de 20H4-9

 · L T Q S P A T L S L S P G E R A ·
 1101 TGTTGACACA GTCTCCAGCC ACCCTGTCTT TGTCTCCAGG GGAAAGAGCC
 ACAACTGTGT CAGAGGTCGG TGGACAGAA ACAGAGGTCC CCTTTCTCGG
 Región variable de CL de 20H4-9

CDR 1

 T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y ·
 1151 ACCCTCTCCT GCAGGGCCAG TCAGAGTGTT AGCAGCTACT TAGCCTGGTA
 TGGGAGAGGA CGTCCCGGTC AGTCTCACAA TCGTCGATGA ATCGGACCAT
 Región variable de CL de 20H4-9

CDR 2

 · Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N ·
 1201 CCAACAGAAA CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GATGCATCCA
 GGTGTCTTT GGACCGGTCC GAGGGTCCGA GGAGTAGATA CTACGTAGGT
 Región variable de CL de 20H4-9

CDR 2

 · R A T G I P A R F S G S G S G T ·
 1251 ACAGGGCCAC TGGCATCCCA GCCAGGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA
 TGTCCCGGTG ACCGTAGGGT CGGTCCAAGT CACCGTCACC CAGACCCTGT
 Región variable de CL de 20H4-9

 D F T L T I S S L E P E D F A V Y ·
 1301 GACTTCACTC TCACCATCAG CAGCCTAGAG CCTGAAGATT TTGCAGTTTA
 CTGAAGTGAG AGTGGTAGTC GTCGGATCTC GGACTTCTAA AACGTCAAAT
 CDR 3

Región variable de CL de 20H4-9

 · Y C Q Q R S N W P P A L T F G G G ·
 1351 TTACTGTGAG CAGCGTAGCA ACTGGCCTCC GCGGCTCACT TTCGGGGGAG
 AATGACAGTC GTCGCATCGT TGACCGGAGG CCGGAGTGA AAGCCGCCTC
 C-kappa

Región variable de CL de 20H4-9

 · T K V E I K R T V A A P S V F I ·
 1401 GGACCAAGGT GGAGATCAA CGTACGGTGG CTGCACCATC TGTCTTCATC
 CCTGGTTCCA CCTCTAGTTT GCATGCCACC GACGTGGTAG ACAGAAGTAG
 C-kappa

 F P P S D E Q L K S G T A S V V C ·
 1451 TTCCCGCCAT CTGATGAGCA GTTGAATCT GGAAGTGCCT CTGTTGTGTG
 AAGGGCGGTA GACTACTCGT CAACTTTAGA CCTTGACGGA GACAACACAC
 C-kappa

 · L L N N F Y P R E A K V Q W K V D ·
 1501 CCTGCTGAAT AACTTCTATC CCAGAGAGGC CAAAGTACAG TGAAGGTGG
 GGACGACTTA TTGAAGATAG GGTCTCTCCG GTTTCATGTC ACCTTCCACC

FIG. 4B

C-kappa

· N A L Q S G N S Q E S V T E Q D
 1551 ATAACGCCCT CCAATCGGGT AACTCCCAGG AGAGTGTAC AGAGCAGGAC
 TATTGCGGGA GGTAGCCCA TTGAGGGTCC TCTCACAGTG TCTCGTCTG
 C-kappa

S K D S T Y S L S S T L T L S K A
 1601 AGCAAGGACA GCACCTACAG CCTCAGCAGC ACCTGACGC TGAGCAAAGC
 TCGTTCCTGT CGTGGATGTC GGAGTCGTG TGGGACTGCG ACTCGTTTCG
 C-kappa

· D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L
 1651 AGACTACGAG AAACACAAAG TCTACGCCTG CGAAGTCACC CATCAGGGCC
 TCTGATGCTC TTTGTGTTT AGATGCGGAC GCTTCAGTGG GTAGTCCCG
 C-kappa

· S S P V T K S F N R G E C
 1701 TGAGCTCGCC CGTCACAAAG AGCTTCAACA GGGGAGAGTG TTAGACCCAG
 ACTCGAGCGG GCAGTGTTT TCGAAGTTGT CCCCTCTCAC AATCTGGGTC
 1751 CTTTCTTGTA CAAAGTGGT GATCTAGAGG GCCCTATTCT ATAGTGTAC
 GAAAGAACAT GTTTCACCAA CTAGATCTCC CGGGATAAGA TATCACAGTG
 1801 CTAATGCTA GAGCTCGCTG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA
 GATTACGAT CTCGAGCGAC TAGTCGGAGC TGACACGGAA GATCAACGGT
 1851 GCCATCTGTT GTTGCCTT CCCCCGTGCC TTCTTGACC CTGGAAGGTG
 CGGTAGACAA CAAACGGGGA GGGGGCACGG AAGGAACTGG GACCTCCAC
 1901 CCACTCCAC TGTCCTTCC TAATAAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTGT
 GGTGAGGGTG ACAGGAAAGG ATTATTTTAC TCCTTTAAGC TAGCGTAACA
 1951 CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT GGGGTGGGGC AGGACAGCAA
 GACTCATCCA CAGTAAGATA AGACCCCCA CCCCACCCG TCCTGTGCTT
 2001 GGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT GCGGTGGGCT
 CCCCCTCCTA ACCCTTCTGT TATCGTCCGT ACGACCCCTA CGCCACCCGA
 2051 CTATGGCTTC TGAGGCGGAA AGAACCAGCT GGGGCTCTAG GGGGTATCCC
 GATACCGAAG ACTCCGCCTT TCTTGGTCTGA CCCCAGATC CCCCATAGGG
 2101 CACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGTTACCGG
 GTGGCGGGA CATCGCCGCG TAATTCGCGC CGCCACACC ACCAATGCGC
 2151 CAGCGTGACC GCTACACTG CACAGCGCCT AGCGCCCGCT CCTTCTGCTT
 GTCGCACTGG CGATGTGAAC GGTGCGGGGA TCGCGGGCGA GAAAGCGAA
 2201 TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCGG GGCCTCTCAA AAAAGGAAA
 AGAAGGGAAG GAAAGAGCGG TGCAAGCGGC CCGGAGAGTT TTTTCCCTTT
 2251 AAAAGCATGC ATCTCAATTA GTCAGCAACC ATAGTCCCGC CCCTAATCC
 TTTTCGTACG TAGAGTTAAT CAGTCGTTGG TATCAGGGCG GGGATTGAGG
 2301 GCCCATCCCG CCCCTAATC CGCCCAGTTC CGCCCATTCT CCGCCCCATG
 CGGGTAGGGC GGGGATTGAG GCGGGTCAAG GCGGTAAGA GCGGGGTAC
 2351 GCTGACTAAT TTTTTTTATT TATGCAGAGG CCGAGGCCG CTGCGCCTCT
 CGACTGATTA AAAAAATAA ATACGTCTCC GGCTCCGGCG GAGCCGGAGA
 2401 GAGCTATTCC AGAAGTAGTG AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC TAGGCTTTG
 CTCGATAAGG TCTTCATCAC TCCTCCGAAA AAACCTCCGG ATCCGAAAAC
 2451 CAAAAAGCTT GGGGGGACAG CTCAGGGCTG CGATTCGCG CCAAACCTGA
 GTTTTTCGAA CCCCCCTGTC GAGTCCCGAC GCTAAAGCGC GGTTTGAACT
 2501 CGGCAATCCT AGCGTGAAGG CTGGTAGGAT TTTATCCCG CTGCCATCAT
 GCCGTTAGGA TCGCACTTCC GACCATCCTA AAATAGGGG GACGGTAGTA
 2551 GGTTCGACCA TTGAACTGCA TCGTCGCCGT GTCCAAAAT ATGGGGATTG
 CCAAGCTGGT AACTTGACGT AGCAGCGGCA CAGGGTTTTA TACCCCTAAC

FIG. 4C

2601 GCAAGAACGG AGACCTACCC TGGCCTCCGC TCAGGAACGA GTTCAAGTAC
CGTTCCTGCC TCTGGATGGG ACCGGAGGCG AGTCCTTGCT CAAGTTCATG
2651 TTCCAAGAA TGACCACAAC CTCTTCAGTG GAAGGTAAC AGAATCTGGT
AAGGTTTCTT ACTGGTGTG GAGAAGTCAC CTTCCATTTG TCTTAGACCA
2701 GATTATGGGT AGGAAAACCT GGTTCCTCAT TCCTGAGAAG AATCGACCTT
CTAATACCCA TCCTTTTGGG CCAAGAGGTA AGGACTCTTC TTAGCTGGAA
2751 TAAAGGACAG AATTAATATA GTTCTCAGTA GAGAACTCAA AGAACCACCA
ATTTCTGTG TTAATTATAT CAAGAGTCAT CTCTTGAGTT TCTTGGTGGT
2801 CGAGGAGCTC ATTTTCTTGC CAAAAGTTTG GATGATGCCT TAAGACTTAT
GCTCCTCGAG TAAAAGAACG GTTTTCAAAC CTACTIONGGA ATTCTGAATA
2851 TGAACAACCG GAATTGGCAA GTAAAGTAGA CATGGTTTGG ATAGTCGGAG
ACTTGTGGC CTTAACCGTT CATTTCATCT GTACCAAACC TCTCAGCTC
2901 GCAGTCTGT TTACCAGGAA GCCATGAATC AACCAGGCCA CCTCAGACTC
CGTCAAGACA AATGGTCCTT CGGTACTTAG TTGGTCCGGT GGAGTCTGAG
2951 TTTGTGACAA GGATCATGCA GGAATTTGAA AGTGACACGT TTTTCCCAGA
AAACTGTT CCTAGTACGT CCTTAAACTT TCACTGTGCA AAAAGGGTCT
3001 AATTGATTTG GGGAAATATA AACTTCTCCC AGAATACCCA GCGTCTCTT
TTAACTAAC CCCTTATAT TTGAAGAGGG TCTTATGGGT CCGCAGGAGA
3051 CTGAGGTCCA GGAGGAAAAA GGCATCAAGT ATAAGTTTGA AGTCTAGAG
GACTCCAGGT CCTCCTTTT CCGTAGTTCA TATTCAACT TCAGATGCTC
3101 AAGAAAGACT AACAGGAAGA TGCTTTCAAG TTCTCTGCTC CCCTCCTAAA
TTCTTTCTGA TTGCTCTTCT ACGAAAGTTC AAGAGACGAG GGGAGGATT
3151 GCTATGCATT TTTATAAGAC CATGGGACTT TTGCTGGCTT TAGATCTGAT
CGATACGTAA AAATATTCTG GTACCCTGAA AACGACCGAA ATCTAGACTA
3201 CTTTGTGAAG GAACCTTACT TCTGTGGTGT GACATAATG GACAACTAC
GAAACACTTC CTTGGAATGA AGACACCACA CTGTATTAAC CTGTTTGATG
3251 CTACAGAGAT TTAAGCTCT AAGGTAATA TAAAATTTT AAGTGTATAA
GATGTCTCTA AATTCGAGA TTCCATTTAT ATTTTAAAA TTCACATATT
3301 TGTGTTAAAC TACTGATTCT AATTGTTTGT GTATTTTAGA TTCCAACCTA
ACACAATTTG ATGACTAAGA TTAACAAACA CATAAATCT AAGGTGGAT
3351 TGGAAGTAT GAATGGGAGC AGTGGTGGAA TGCCTTAAT GAGGAAAACC
ACCTTGACTA CTTACCCTCG TCACCACCTT ACGGAAATTA CTCCTTTGG
3401 TGTTTTGCTC AGAAGAAATG CCATCTAGTG ATGATGAGGC TACTGCTGAC
ACAAAACGAG TCTTCTTAC GGTAGATCAC TACTACTCCG ATGACGACTG
3451 TCTCAACATT CTACTCCTCC AAAAAAGAAG AGAAAGGTAG AAGACCCCAA
AGAGTTGTAA GATGAGGAGG TTTTCTTTC TCTTCCATC TTCTGGGGTT
3501 GGACTTTCCT TCAGAAATTC TAGTTTTTT GAGTCATGCT GTCTTTAGTA
CCTGAAAGGA AGTCTTAACG ATTCAAAAAA CTCAGTACGA CACAAATCAT
3551 ATAGAACTCT TGCTTGCTTT GCTATTTACA CCACAAAGGA AAAAGCTGCA
TATCTTGAGA ACGAACGAAA CGATAAATGT GGTGTTTCTT TTTTCGACGT
3601 CTGCTATACA AGAAAATTAT GGAAAAATAT TCTGTAACCT TTATAAGTAG
GACGATATGT TCTTTTAATA CCTTTTATA AGACATTGGA AATATTCATC
3651 GCATAACAGT TATAATCATA ACATACTGTT TTTTCTTACT CCACACAGGC
CGTATTGICA ATATTAGTAT TGTATGACAA AAAAGAATGA GGTGTGTCCG
3701 ATAGAGTGTC TGCTATTAAT AACTATGCTC AAAAATTGTG TACCTTTAGC
TATCTCACAG ACGATAATTA TTGATACGAG TTTTAAACAC ATGGAAATCG
3751 TTTTAAATTT GTAAAGGGGT TAATAAGGAA TATTTGATGT ATAGTGCCTT
AAAAATTTAA CATTTCCTCA ATTATTCCTT ATAACTACA TATCACGGAA
3801 GACTAGAGAT CGATCATAAT CAGCCATACC ACATTTGTAG AGGTTTACT
CTGATCTCTA GCTAGTATTA GTCGGTATGG TGTAACATC TCCAAAATGA
3851 TGCTTTAAAA AACCTCCCAC ACCTCCCCCT GAACCTGAAA CATAAAATGA
ACGAAATTTT TTGGAGGGTG TGGAGGGGGA CTTGGACTTT GTATTTTACT
3901 ATGCAATTGT TGTTGTTAAC TTGTTTATTG CAGCTTATAA TGGTTACAAA
TACGTTAACA ACAACAATTG AACAAATAAC GTCGAATATT ACCAATGTTT

FIG. 4D

3951 TAAAGCAATA GCATCACAAA TTTCACAAAT AAAGCATTTT TTTCACTGCA
 ATTTTCGTTAT CGTAGTGTTT AAAGTGTTTA TTTCGTAAAA AAAGTGACGT
 4001 TTCTAGTTGT GGTGTGTTT AACTCATCAA TGTATCTTAT CATGTCGGA
 AAGATCAACA CCAAACAGGT TTGAGTAGTT ACATAGAATA GTACAGACCT
 4051 TCGGCTGGAT GATCCTCCAG CGCGGGGATC TCATGCTGGA GTTCTTCGCC
 AGCCGACCTA CTAGGAGGTC GCGCCCTAG AGTACGACCT CAAGAAGCGG
 4101 CACCCCAACT TGTTTATTGC AGCTTATAAT GGTTACAAAT AAAGCAATAG
 GTGGGGTTGA ACAAATAACG TCGAATATTA CCAATGTTTA TTTCGTTATC
 4151 CATCACAAAT TTCACAAATA AAGCATTTTT TTCACTGCAT TCTAGTTGTG
 GTAGTGTTTA AAGTGTTTAT TTCGTAAAAA AAGTGACGTA AGATCAACAC
 4201 GTTTGTCCAA ACTCATCAAT GTATCTTATC ATGTCTGTAT ACCGTGACC
 CAAACAGGTT TGAGTAGTTA CATAGAATAG TACAGACATA TGGCAGCTGG
 4251 TCTAGCTAGA GCTTGGCGTA ATCATGGTCA TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA
 AGATCGATCT CGAACCGCAT TAGTACCAGT ATCGACAAAG GACACACTTT
 4301 TTGTTATCCG CTCACAATTC CACACAACAT ACGAGCCGGA AGCATAAAGT
 AACAAATAGGC GAGTGTTAAG GTGTGTTGTA TGCTCGGCC TCGTATTTCA
 4351 GTAAAGCCTG GGTGCTTAA TGAGTGAGCT AACTCACATT AATGCGTTG
 CATTTCCGAC CCCACGGATT ACTCACTCGA TTGAGTGTA TTAACGCAAC
 4401 CGCTCACTGC CCGCTTTCCA GTCGGGAAAC CTGTCTGTC AGTCGATTA
 GCGAGTGACG GCGGAAAGGT CAGCCCTTTG GACAGCACGG TCGACGTAAT
 4451 ATGAATCGGC CAACGCGCGG GGAGAGGCGG TTTGCGTATT GGGCGCTCTT
 TACTTAGCCG GTTGC GCGCC CTCTCCGCC AAACGCATAA CCCGCGAGAA
 4501 CCGCTTCCTC GCTCACTGAC TCGCTGCGCT CGGTGCTTCG GCTGCGGCGA
 GCGGAAGGAG CGAGTGACTG AGCGACGCGA GCCAGCAAGC CGACGCCGCT
 4551 GCGGTATCAG CTCACTCAA GGCGGTAATA CGGTTATCCA CAGAATCAGG
 CGCCATAGTC GAGTGAGTTT CCGCCATTAT GCCAATAGGT GTCTTAGTCC
 4601 GGATAACGCA GGAAAGAACA TGTGAGCAA AGGCCAGCAA AAGCCAGGA
 CCTATTGCGT CCTTTCTTGT ACACTCGTTT TCCGGTCTGT TCCGGTCTCT
 4651 ACCGTA AAAA GGCCGCGTTG CTGGCGTTTT TCCATAGGCT CCGCCCCCTT
 TGGCATTFTT CCGGCGCAAC GACCGCAAAA AGGTATCCGA GCGCGGGGGA
 4701 GACGAGCATC AAAAAATCG ACGCTCAAGT CAGAGGTGGC GAAACCCGAC
 CTGCTCGTAG TGTTTTTAGC TGCGAGTTCA GTCTCCACCG CTTTGGGCTG
 4751 AGGACTATAA AGATACCAGG CGTTTCCCC TGGAGCTCC CTCGTGCGCT
 TCCTGATATT TCTATGGTCC GCAAAGGGGG ACCTTCGAGG GAGCACGCGA
 4801 CTCCTGTTC GACCCTGCCG CTTACCGGAT ACCTGTCCGC CTTTCTCCCT
 GAGGACAAGG CTGGGACGGC GAATGGCCTA TGGACAGGCG GAAAGAGGGA
 4851 TCGGGAGCG TGGCGCTTC TCATAGCTCA CGCTGTAGGT ATCTCASTTC
 AGCCCTTCGC ACCGCGAAAG AGTATCGAGT GCGACATCCA TAGAGTCAAG
 4901 GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA AGCTGGGCTG TGTGCACGAA CCCCCGTTT
 CCACATCCAG CAAGCGAGGT TCGACCCGAC ACACGTGCTT GGGGGGCAAG
 4951 AGCCCGACCG CTGCGCCTTA TCCGGTAACT ATCGTCTTGA GTCCAACCCG
 TCGGGCTGGC GACGCGGAAT AGGCCATTGA TAGCAGAACT CAGGTGGGGC
 5001 GTAAGACACG ACTTATCGCC ACTGGCAGCA GCCACTGGTA ACAGGATTAG
 CATTCTGTGC TGAATAGCGG TGACCGTCGT CCGTGACCAT TGTCCTAATC
 5051 CAGAGCGAGG TATGTAGGCG GTGCTACAGA GTTCTTGAAG TGGTGGCCTA
 GTCTCGCTCC ATACATCCGC CACGATGTCT CAAGAACTTC ACCACCGGAT
 5101 ACTACGGCTA CACTAGAAGG AACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGTGAA
 TGATGCCGAT GTGATCTTCC TTGTCATAAA CCATAGACGC GAGACGACTT
 5151 GCCAGTTACC TTCGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAAACAA
 CCGTCAATGG AAGCCTTTTT CTCAACCATC GAGAACTAGG CCGTTTGTTT
 5201 CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTGTGTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC
 GGTGGCGACC ATCGCCACCA AAAAAACAAA CGTTCGTCTG CTAATGCGCG
 5251 AGAAAAAAG GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA
 TCTTTTTTTC CTAGAGTTCT TCTAGGAAAC TAGAAAAGAT GCCCCAGACT

FIG. 4E

5301 CGCTCAGTGG AACGAAACT CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT
 GCGAGTCACC TTGCTTTTGA GTGCAATTCC CTAAAACCAG TACTCTAATA
 5351 CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTAA ATAAAAATG AAGTTTTAAA
 GTTTTTCTTA GAAGTGGATC TAGGAAAATT TAATTTTTAC TTCAAAATTT
 5401 TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT
 AGTTAGATTT CATATATACT CATTTGAACC AGACTGTCAA TGGTTACGAA
 5451 AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTTCGT TCATCCATAG
 TTAGTCACTC CGTGGATAGA GTCGCTAGAC AGATAAAGCA AGTAGGTATC
 5501 TTGCCTGACT CCCCCTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA
 AACGGACTGA GGGGCAGCAC ATCTATTGAT GCTATGCCCT CCCGAATGGT
 5551 TCTGGCCCA GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCCGCTCC
 AGACCGGGT CACGACGTTA CTATGGCGCT CTGGGTGCGA GTGGCCGAGG
 5601 AGATTTATCA GCAATAAAC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG
 TCTAAATAGT CGTTATTTGG TCGGTCGGCC TTCCCGGCTC GCGTCTTCAC
 5651 GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATG TTGCCGGGAA
 CAGGACGTTG AAATAGCCGG AGGTAGGTC AATAATTAAC AACGGCCCTT
 5701 GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT
 CGATCTCATT CATCAAGCGG TCAATTATCA AACCGTTCG AACAACGGTA
 5751 TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA
 ACGATGTCCG TAGCACCACA GTGCGAGCAG CAAACCATAC CGAAGTAAGT
 5801 GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC
 CGAGGCCAAG GGTTGCTAGT TCCGCTCAAT GTACTAGGGG GTACAACAGG
 5851 AAAAAAGCGG TTAGCTCCTT CGGTCCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT
 TTTTTTCGCC AATCGAGGAA GCCAGGAGGC TAGCAACAGT CTTCAATCAA
 5901 GGCCGCAATG TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA
 CCGCGTAC AATAGTGAGT ACCAATACCG TCGTGACGTA TTAAGAGAAT
 5951 CTGTCATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG TGACTGGTGA GTACTCAACC
 GACAGTACGG TAGGCATTCT ACGAAAAGAC ACTGACCACT CATGAGTTGG
 6001 AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGCGCA CCGAGTTGCT CTTGCCCGGC
 TTCAGTAAGA CTCTTATCAC ATACGCCGCT GGCTCAACGA GAACGGGCCG
 6051 GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA
 CAGTTATGCC CTATTATGGC GCGGTGTATC GTCTTGAAAT TTTCACGAGT
 6101 TCATTGAAA ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG
 AGTAACCTTT TGCAAGAAGC CCCGCTTTG AGAGTTCTTA GAATGGCGAC
 6151 TTGAGATCCA GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAAC GATCTTCAGC
 AACTCTAGGT CAAGCTACAT TGGGTGAGCA CGTGGGTGA CTAGAAGTCG
 6201 ATCTTTTACT TTCACCGAGC TTTCTGGCTG TTTCTGGCTG TTTCTGGCTG
 TAGAAAATGA AAGTGGTCGC AAAGACCCAC TCGTTTTTGT CTTCCGTTT
 6251 ATGCCGAAA AAAGGGAATA AGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA
 TACGGCGTTT TTTCCCTTAT TCCCGCTGTG CCTTTACAAC TTATGAGTAT
 6301 CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGCTCAT
 GAGAAGGAAA AAGTTATAAT AACTTCGTAA ATAGTCCCAA TAACAGAGTA
 6351 GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTT
 CTCGCCTATG TATAAACTTA CATAAATCTT TTTATTTGTT TATCCCCAAG
 6401 CGCGCACATT TCCCCGAAA GTGCCACCTG ACGTC
 GCGCGTGTAA AGGGGCTTTT CACGGTGGAC TGCAG

FIG. 4F

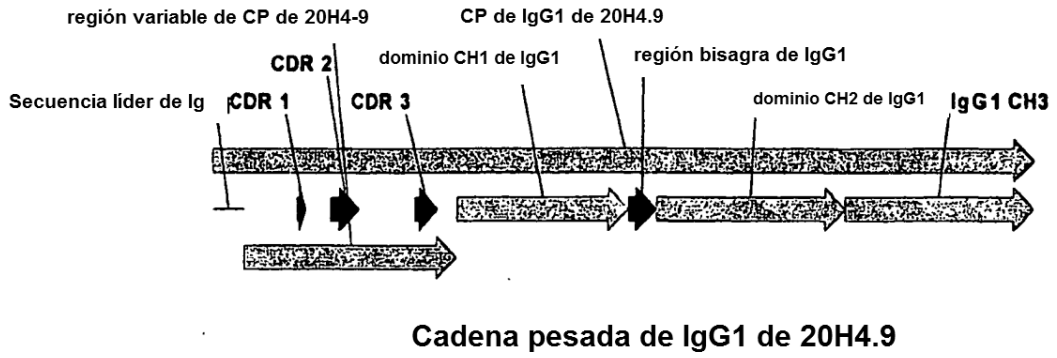


FIG. 5

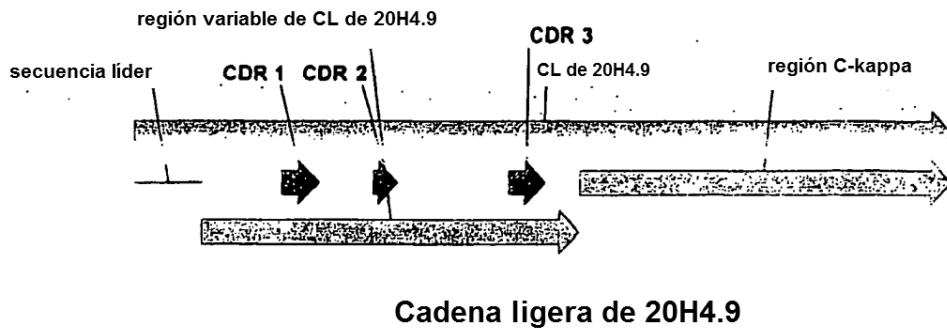


FIG. 6

Péptido líder Ig natural

```

-----
  M K H L W F F L L L V A A P R W V
1  ATGAAACACC TGTGGTTCTT CCTCCTCCTG GTGGCAGCTC CCAGATGGGT
   TACTTTGTGG ACACCAAGAA GGAGGAGGAC CACCGTCGAG GGTCTACCCA
-----
                                     Región variable de CP de 20H4.9
-----
  L S Q V Q L Q Q W G A G L L K P S
51  CCTGTCCCAG GTGCAACTAC AGCAGTGGGG CGCAGGACTG TTGAAGCCTT
   GGACAGGGTC CACGTTGATG TCGTCACCCC GCGTCTGAC AACTTCGGAA
                                     CDR 1
                                     ---
                                     Región variable de CP de 20H4.9
-----
  E T L S L T C A V Y G G S F S G
101  CGGAGACCCT GTCCCTCACC TGCCTGTCT ATGGTGGGTC CTTAGTGGT
   GCCTCTGGGA CAGGGAGTGG ACGCGACAGA TACCACCCAG GAAGTCACCA
   CDR 1
-----
                                     Región variable de CP de 20H4.9
-----
  Y Y W S W I R Q S P E K G L E W I
151  TACTACTGGA GCTGGATACG CCAGTCCCCA GAGAAGGGGC TGGAGTGGAT
   ATGATGACCT CGACCTATGC GGTCAGGGGT CTCTTCCCG ACCTCACCTA
   CDR 2
-----
                                     Región variable de CP de 20H4.9
-----
  G E I N H G G Y V T Y N P S L E S
201  TGGGGAAATC AATCATGGTG GATACGTCAC CTACAATCCG TCCCTCGAGA
   ACCCCTTTAG TTAGTACCAC CTATGCAGTG GATGTTAGGC AGGGAGCTCT
   CDR 2
   --
                                     Región variable de CP de 20H4.9
-----
  R V T I S V D T S K N Q F S L K
251  GTCGAGTCAC CATATCAGTA GACACGTCCA AGAACAGTT CTCCTGAAG
   CAGCTCAGTG GTATAGTCAT CTGTGCAGGT TCTTGGTCAA GAGGGACTTC
                                     CDR 3
                                     ---
                                     Región variable de CP de 20H4.9
-----
  L S S V T A A D T A V Y Y C A R D
301  CTGAGCTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCT GTATATTACT GTGCGAGGGA
   GACTCGAGAC ACTGGCGGCG CCTGTGCCGA CATATAATGA CAGCTCCCT
   CDR 3
-----
                                     Región variable de CP de 20H4.9
-----
  Y G P G N Y D W Y F D L W G R G T
351  CTATGGTCCG GGAATTATG ACTGGTACTT CGATCTCTGG GGCCGTGGCA
   GATACCAGGC CCCTTAATAC TGACCATGAA GCTAGAGACC CCGCACCGT

```

FIG. 7A

Dominio CH1 de IgG1

 Región variable de CP de 20H4.9

· L V T V S S A S T K G P S V F P ·
 401 CCCTGGTCAC TGTCTCCTCA GCCTCCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC
 GGGACCAGTG ACAGAGGAGT CGGAGGTGGT TCCCGGTAG CCAGAAGGGG
 Dominio CH1 de IgG1

· L A P S S K S T S G G T A A L G C ·
 451 CTGGCACCCT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG
 GACCGTGGGA GGAGGTTCTC GTGGAGACCC CCGTGTCCG GGGACCCGAC
 Dominio CH1 de IgG1

· L V K D Y F P E P V T V S W N S G ·
 501 CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTGCG TGGAActCAG
 GGACCAGTTC CTGATGAAGG GGCTTGGCCA CTGCCACAGC ACCTTGAGTC
 Dominio CH1 de IgG1

· A L T S G V H T F P A V L Q S S ·
 551 GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTT ACAGTCTCA
 CGCGGGACTG GTCGCCGCAC GTGTGGAAGG GCCGACAGGA TGTCAGGAGT
 Dominio CH1 de IgG1

· G L Y S L S S V V T V P S S S L G ·
 601 GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTGGG
 CCTGAGATGA GGGAGTCTGC GCACCACTGG CACGGGAGGT CGTCGAACCC
 Dominio CH1 de IgG1

· T Q T Y I C N V N H K P S N T K V ·
 651 CACCCAGACC TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG
 GTGGGTCTGG ATGTAGACGT TGCACCTAGT GTTCGGGTCG TTGTGGTTC
 IgG1 CH1 domain

 Región bisagra de IgG1

· D K R V E P K S C D K T H T C P ·
 701 TGGACAAGAG AGTTGAGCCC AAATCTGTG ACAAActCA CACATGCCCA
 ACCTGTTCTC TCAACTCGGG TTTAGAACAC TGTTTTGAGT GTGTACGGGT
 Dominio CH2 de IgG1

 Región bisagra de IgG1

· P C P A P E L L G G P S V F L F P ·
 751 CCGTCCCCAG CACTGAACT CCTGGGGGGA CCGTCAGTCT TCCTTCCC
 GGCACGGGTC GTGGACTTGA GGACCCCTT GGCAGTCAGA AGGAGAAGGG
 Dominio CH2 de IgG1

· P K P K D T L M I S R T P E V T C ·
 801 CAAAAACCC AAGGACACC TCATGATCTC CCGGACCCCT GAGGTCACAT
 GGGTTTTGGG TTCCTGTGGG AGTACTAGAG GCCTGGGGA CTCCAGTGTA

FIG. 7B

Dominio CH2 de IgG1

 · V V V D V S H E D P E V K F N W ·
 851 GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG
 CGCACCACCA CCTGCACTCG GTGCTTCTGG GACTCCAGTT CAAGTTGACC
 Dominio CH2 de IgG1

 Y V D G V E V H N A K T K P R E E ·
 901 TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA
 ATGCACCTGC CGCACCTCCA CGTATTACGG TTCTGTTTCG GCGCCCTCCT
 Dominio CH2 de IgG1

 · Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q ·
 951 GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC
 CGTCATGTTG TCGTGCATGG CACACCAGTC GCAGGAGTGG CAGGACGTGG
 Dominio CH2 de IgG1

 · D W L N G K E Y K C K V S N K A ·
 1001 AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC
 TCCTGACCGA CTTACCGTTC CTCATGTTCA CGTTCAGAG GTTGTTCGGC
 Dominio CH3 de IgG1

Dominio CH2 de IgG1

 L P A P I E K T I S K A K G Q P R ·
 1051 CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG
 GAGGGTCGGG GGTAGCTCTT TTGGTAGAGG TTTCCGGTTC CCGTCGGGGC
 Dominio CH3 de IgG1

 · E P Q V Y T L P P S R D E L T K N ·
 1101 AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC CCGGGATGAG CTGACCAAGA
 TCTTGGTGC CACATGTGGG ACGGGGGTAG GGCCCTACTC GACTGGTTCT
 Dominio CH3 de IgG1

 · Q V S L T C L V K G F Y P S D I ·
 1151 ACCAGGTCAG CCTGACCTCC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC
 TGGTCCAGTC GGA CTGGACG GACCAGTTTC CGAAGATAGG GTCGCTGTAG
 Dominio CH3 de IgG1

 A V E W E S N G Q P E N N Y K T T ·
 1201 GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGAGCCG GAGAACAAC ACAAGACCAC
 CGGCACCTCA CCCTCTCGTT ACCCGTCGGC CTCTGTGTA TGTTCTGGTG
 Dominio CH3 de IgG1

 · P P V L D S D G S F F L Y S K L T ·
 1251 GCCTCCCGTG CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTCCTCTAC AGCAAGCTCA
 CGGAGGGCAC GACCTGAGGC TGCCGAGGAA GAAGGAGATG TCGTTCGAGT
 Dominio CH3 de IgG1

 · V D K S R W Q Q G N V F S C S V ·
 1301 CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG
 GGCACCTGTT CTCGTCCACC GTCGTCCCCT TGCAGAAGAG TACGAGGCAC

FIG. 7C

Dominio CH3 de IgG1

```
-----  
M H E A L H N H Y T Q K S L S L S .  
1351 ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC  
TACGTACTCC GAGACGTGTT GGTGATGTGC GTCTTCTCGG AGAGGGACAG  
Dominio CH3 de IgG1  
-----  
· P G K  
1401 CCCGGGTAAA TGA  
GGGCCCATTT ACT
```

FIG. 7D

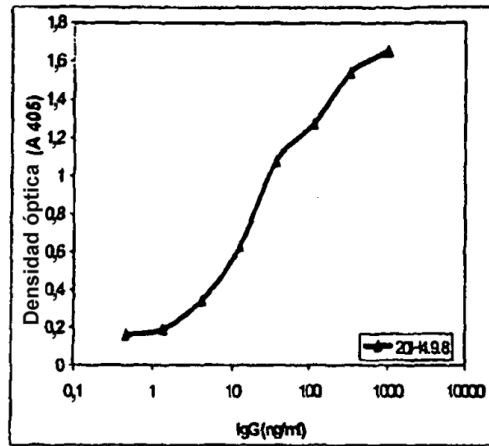


FIG. 8A

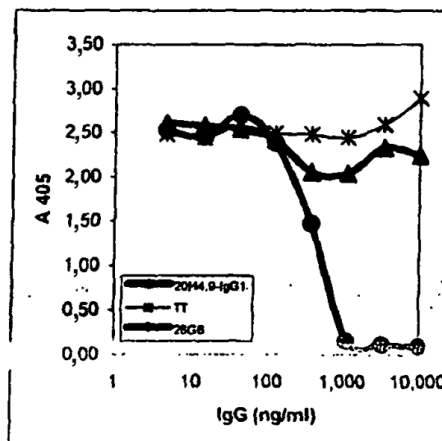


FIG. 8B

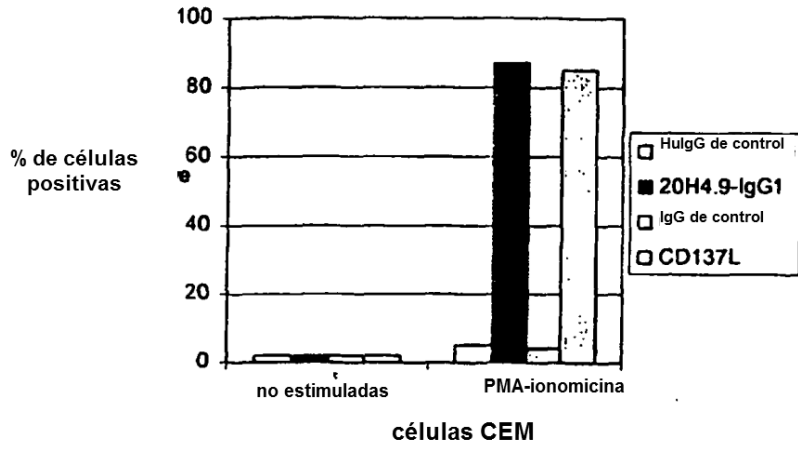


FIG. 9A

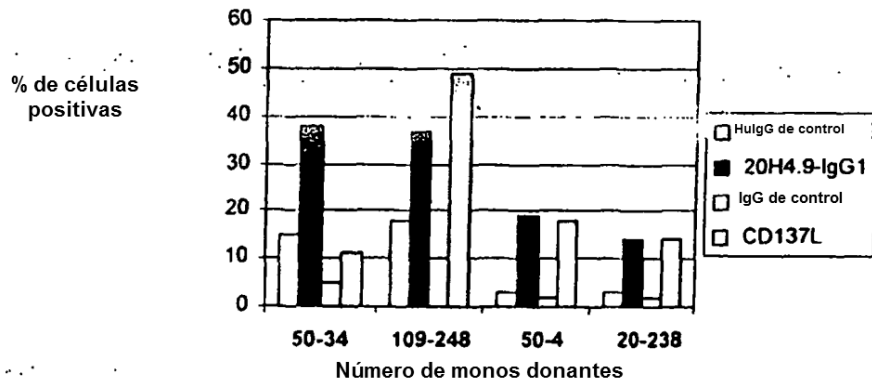


FIG. 9B

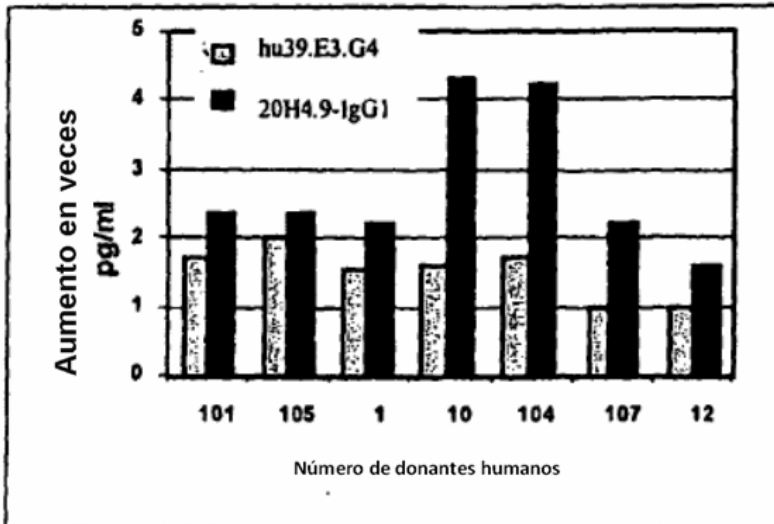


FIG. 10A

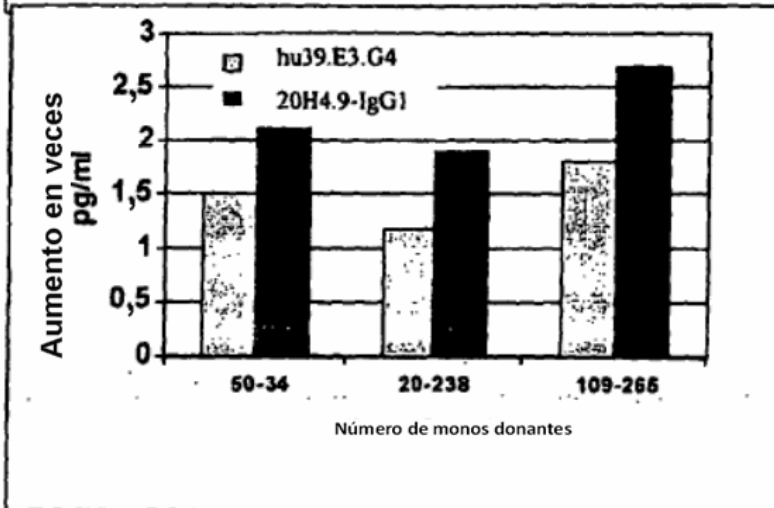


FIG. 10B

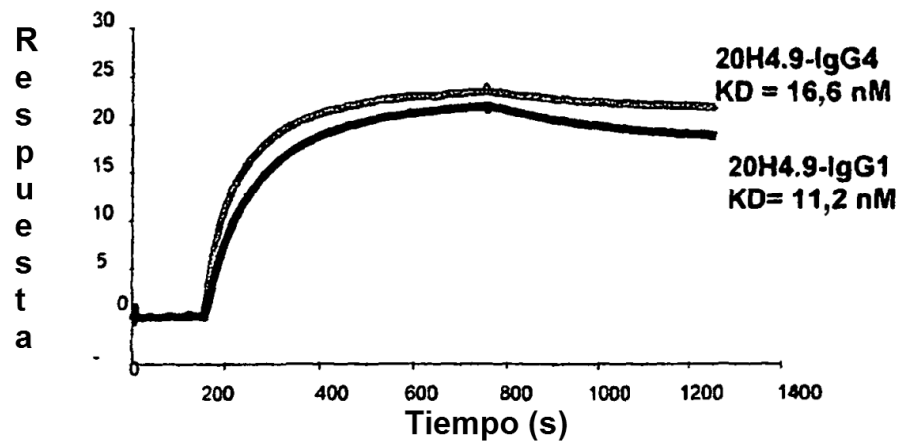


FIG. 11

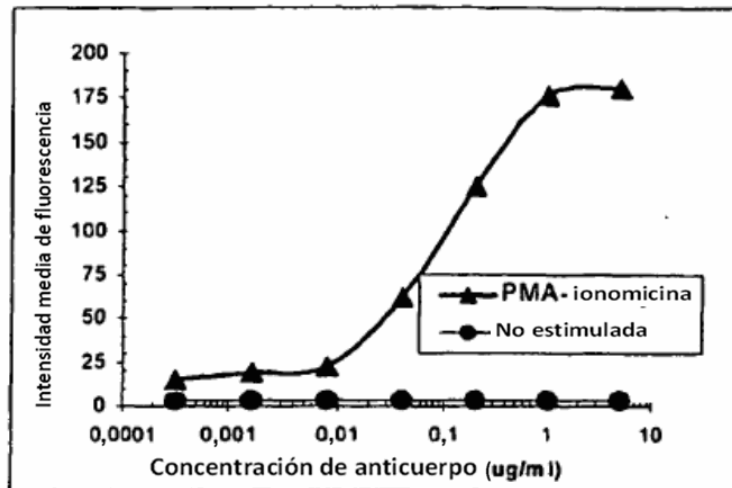


FIG. 12

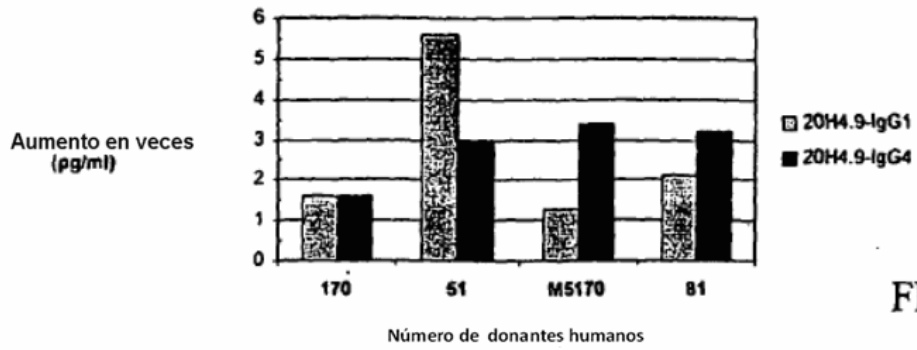


FIG. 13A

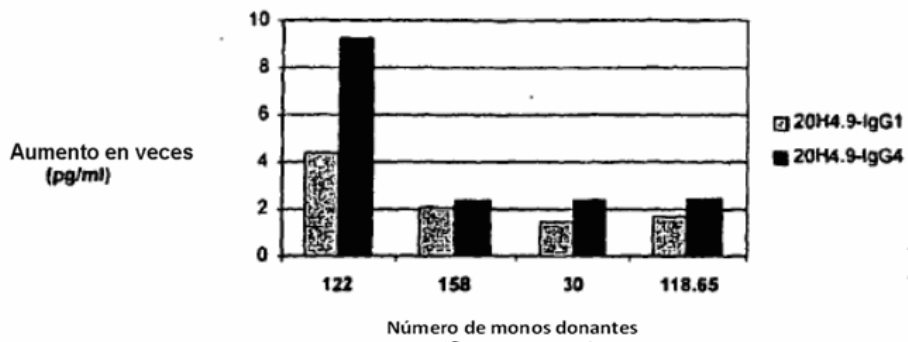


FIG. 13B

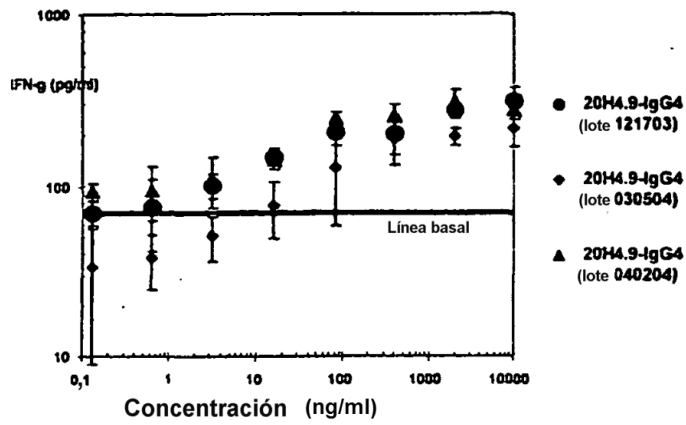


FIG. 14A

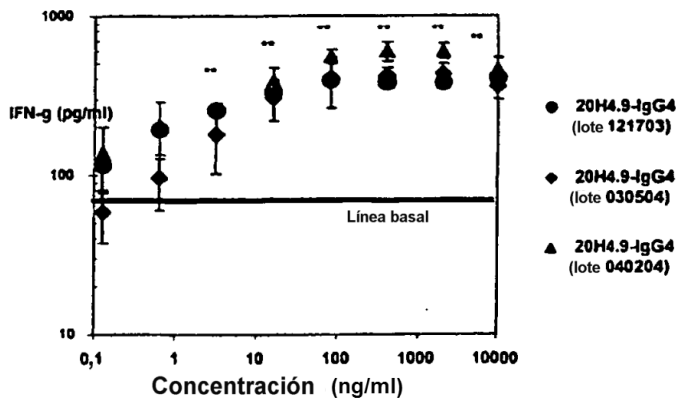


FIG. 14B

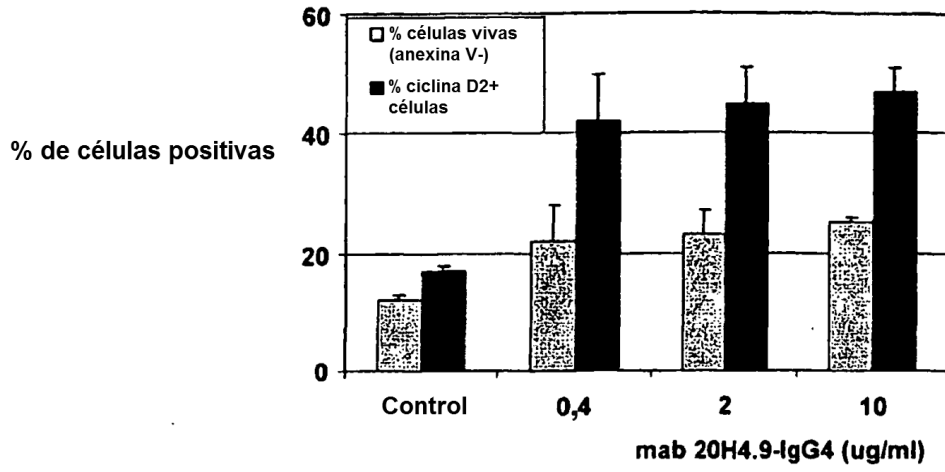


FIG. 15

FIG. 16A

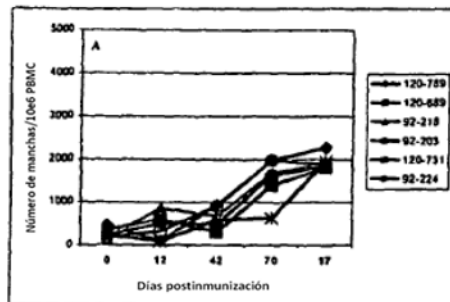


FIG. 16B

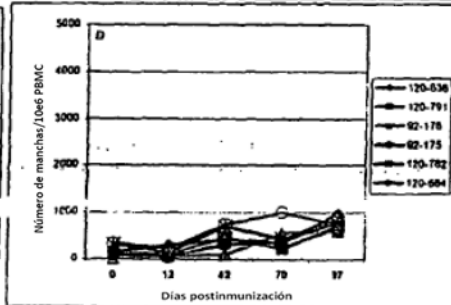
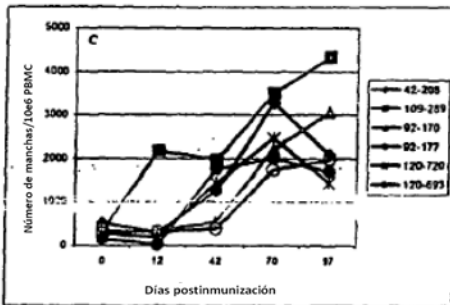
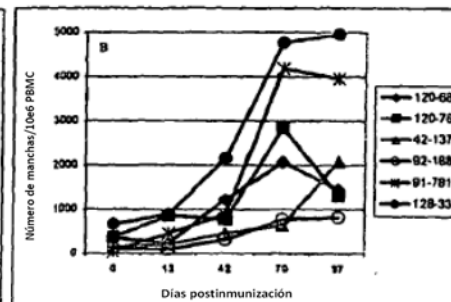


FIG. 16C

FIG. 16D