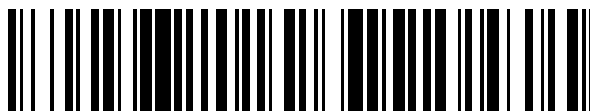


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 760**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2009** **E 09752708 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015** **EP 2358755**

54 Título: **Anticuerpos de c-Met**

30 Prioridad:

21.11.2008 US 116825 P

24.06.2009 US 219903 P

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

02.11.2015

73 Titular/es:

ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US

72 Inventor/es:

DAVIES, JULIAN;
LIU, LING;
LU, JIRONG;
VAILLANCOURT, PETER EDWARD;
WORTINGER, MARK ANDREW y
ZENG, WEI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 549 760 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 de c-Met

La presente invención se refiere a anticuerpos que se unen a c-Met y a su uso en el tratamiento de afecciones y trastornos en los que la patogenia está mediada por este receptor.

- 5 c-Met, un miembro de la superfamilia de tirosina quinasa, es el receptor para el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). La unión de HGF a c-Met conduce a la dimerización o multimerización del receptor, la fosforilación de múltiples residuos de tirosina en la región intracelular, la activación catalítica, y la señalización aguas abajo. c-Met también se activa a través de mecanismos independientes de ligando, incluyendo sobreexpresión del receptor, amplificación y mutación. La activación de c-Met aumenta la proliferación celular, la migración, la morfogénesis, la supervivencia (incluyendo la protección de la apoptosis) y la síntesis de la proteasa, las características que están asociadas con el fenotipo de células invasoras y desenlaces clínicos malos y la resistencia a fármacos en pacientes con cáncer. La vía de señalización de c-Met es una de las vías mal reguladas con más frecuencia en los cánceres humanos, y se produce en casi todos los tipos de tumores sólidos.

- 15 La publicación internacional PCT WO 09/007427 divulga anticuerpos frente c-Met humanizados con injertos de CDR. El anticuerpo murino 224G11 divulgado en dicha publicación no se unía al dominio c-Met Sema. Otras propiedades funcionales del derivado de IgG1 humanizada de este anticuerpo murino denominado Mab h224G11, se comunican en los resúmenes n° 835 (datos *in vitro*) y 2792 (datos *in vivo*) y sus pósteres adjuntos presentados en la reunión de la American Association for Cancer Research (Denver, CO) en Abril de 2009. Estos resúmenes y pósteres divulgan que el Mab h224G11 bivalente está desprovisto de propiedades agonistas, se comporta como antagonista completo de c-Met, y disminuye potencialmente la dimerización de c-Met. Se notifica que 224G11 murino regula por disminución c-Met y bloquea la fosforilación de c-Met *in vivo*. En el caso de otros receptores, la dimerización es un requisito previo para la internalización y degradación del receptor. Estos resúmenes y pósteres no divulgan datos relativos a la internalización de c-Met. Además, el epítipo al que el anticuerpo humanizado se une dentro de c-Met no se identifica.

- 25 La publicación internacional PCT WO 05/016382 También divulga anticuerpos c-Met, pero no identifica el epítipo (s) al que se unen los anticuerpos. Se proporciona un ejemplo de mapeo de epítipos, sin embargo, los resultados presentados indican simplemente que anticuerpos frente a c-Met se unen a un epítipo común, mientras el séptimo anticuerpo frente a c-Met se une a un epítipo distinto. Los epítipos particulares a los que se unen estos anticuerpos c-Met no se proporcionan.

- 30 Existe una necesidad de anticuerpos antagonistas humanos frente a c-Met, cuya unión a la cadena α de c-Met humano facilita la internalización del receptor de la superficie celular, en presencia y / o ausencia de HGF. Existe una necesidad de anticuerpos antagonistas frente a c-Met humanos, cuya unión a la cadena α de c-Met humano facilita la internalización del receptor de la superficie celular, en células que comprenden variantes de c-Met que contienen ganancia de mutaciones de función. También hay una necesidad de anticuerpos antagonistas frente a c-Met humanos que inducen la degradación de c-Met y la reducción de c-Met fosforilados. Tales actividades antagonistas podrían disminuir el número de sitios de unión disponibles para HGF en las superficies de células tumorales, y terminar la activación de la vía causada por la sobreexpresión, amplificación, o mutación de c-Met. Al mismo tiempo, dichos anticuerpos antagonistas deben inhibir la unión de HGF a c-Met y la activación de c-Met inducida por HGF, e inducir poca o ninguna actividad agonista de sí mismos.

- 40 Los compuestos anticuerpos de la presente invención satisfacen estas necesidades. Se unen a epítipos en la cadena el α del dominio Sema de c-Met humano, inhibiendo la unión de HGF a c-Met y la activación del receptor, mientras que induce poca o ninguna actividad agonista. Los anticuerpos de la presente invención también inducen la internalización del receptor en presencia o ausencia de HGF y también en células que comprenden variantes de c-Met que contienen ganancia de mutaciones de funciones. Inducen la degradación de c-Met e inducen la reducción de c-Met humano fosforilado e inhiben la proliferación dependiente de HGF y e independiente e HGF de las células tumorales que expresan este receptor. En vista de estas propiedades, estos compuestos de anticuerpos deben ser terapéuticamente útiles en el tratamiento de cánceres mediados por c-Met a través de una variedad de diferentes mecanismos.

- 45 Además, los presentes compuestos de anticuerpos poseen un número de otras propiedades deseables. Exhiben una afinidad (K_D) alta por c-Met, bloquean la fosforilación de c-Met mediada por HGF y la señalización corriente abajo, la proliferación celular y la migración celular; e inducen únicamente fosforilación débil de c-Met, mientras inducen poca o ninguna actividad agonista biológica similar a HGF, tal como la inducción de la proliferación de células tumorales, motilidad, invasión, tubulogénesis, angiogénesis, o efectos antiapoptóticos. Inhiben la activación de la vía de c-Met tanto dependiente de ligando (HGF) como independiente y de ligando. Adicionalmente, los compuestos de anticuerpos de la presente invención se unen preferentemente al dominio extracelular (DEC) de c-Met humano en comparación con los DEC de los receptores estrechamente relacionados Ron y Plexina A2, y no causan "desprendimiento" del DEC de c-Met.

Según la presente invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal frente a c-Met, o fragmento de unión a

antígeno del mismo, que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) y tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR), en el que LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SVSSSVSSIYLH (SEC ID N° 53), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEC ID N° 54), LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QVYSGYPLT (SEC ID N° 56), HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTDYMH (SEC ID N° 65), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEC ID N° 68), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos ANWLDY (SEC ID N° 69).

Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención se une a un epítipo dentro de la cadena α de c-Met humano e induce la internalización de c-Met humano de la superficie celular.

Más preferiblemente, el anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención induce internalización independiente del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) del c-Met de la superficie celular.

Incluso más preferiblemente, el anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención se une dentro de una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

- a) ¹²¹VVDYYDDQL₁₃₀ (SEC ID N° 77),
- b) ¹³¹ISCGSVNRGTCQRHVFPNHHTADIQS₁₅₆ (SEC ID N° 78),
- c) ¹⁷⁹ALGAKVLSSVKDRFINF₁₉₅ (SEC ID N° 79), y
- d) ²¹⁶VRRLKETKDGM₂₂₇ (SEC ID N° 80).

Se prefiere que el anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención se une dentro de una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

- a. ¹²³DTYYDD₁₂₈ (SEC ID N° 81),
- b. ¹⁴⁴HVFPNHHTADIQS₁₅₆ (SEC ID N° 82),
- c. ¹⁹²FINF₁₉₅ (SEC ID N° 83), y
- d. ²²⁰KETKDGM₂₂₇ (SEC ID N° 84).

Aún más preferido es un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención que se une una secuencia de aminoácidos dentro del epítipo conformacional que se caracteriza por ¹²³DTYYDD₁₂₈ (SEC ID N° 81), ¹⁴⁴HVFPNHHTADIQS₁₅₆ (SEC ID N° 82), ¹⁹²FINF₁₉₅ (SEC ID N° 83) y ²²⁰KETKDGM₂₂₇ (SEC ID N° 84) inclusive.

Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende una región variable de la cadena ligera (LCVR) y una región variable de la cadena pesada (HCVR), en el que la LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 5 y la HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 17.

Se prefiere que el anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprenda una cadena ligera que tiene una región constante kappa y una cadena pesada que tiene una región constante de cadena pesada IgG4.

La cadena ligera está codificada preferiblemente por la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N° 35, y la cadena pesada está codificada preferiblemente por la secuencia de polinucleótido de SEC ID N° 47.

Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención comprende dos cadenas ligeras codificadas por la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N° 35 y dos cadenas pesadas codificadas por la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N° 47.

Más preferiblemente, el anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención tiene una cadena ligera que es idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N° 35; y una cadena pesada que es idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por la SEC ID N° 47.

Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención, comprende dos cadenas ligeras, en las que el ácido amino de la cadena ligera es idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N° 35; y dos cadenas pesadas en las que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada es idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por SEC ID N° 47.

Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 29 y una cadena pesada que tiene una región constante de LA cadena pesada de IgG4.

- 5 Incluso más preferiblemente, el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención comprende dos cadenas ligeras que tienen la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 29 y dos cadenas pesadas que tienen una región constante de cadena pesada de IgG4.

De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, la presente invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 10 De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención para uso en terapia.

Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de la presente invención es para uso en el tratamiento del cáncer en un ser humano.

- 15 Más preferiblemente, el anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la presente invención es para tratar cáncer gástrico, de riñón, de colon, colorrectal, de cabeza y cuello, de próstata, melanoma o de pulmón.

Por consiguiente, la presente invención proporciona:

Un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que:

- a) se une a un epítipo dentro de la cadena α de c-Met humano y
 20 b) induce la internalización del c-Met humano de la superficie celular.

- 25 Uno cualquiera de los anticuerpos anteriores o fragmento de unión a antígeno del mismo en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo induce la internalización independiente del factor de crecimiento de hepatocitos de c-Met humano de la superficie celular. En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 28 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 40. En otra realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 29 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 41.

- 30 Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que induce la internalización de c-Met humano en las células que comprenden una variante de c-Met humano que contiene una ganancia mutación de función. La ganancia de la mutación de función puede ser una mutación del dominio quinasa de c-Met M149T o mutación en el dominio yuxtapamembranal R988C.

- 35 Cualquiera de los anticuerpos anteriores o fragmentos de unión a antígeno del mismo en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo induce al menos un 40 % de internalización en las células de c-Met humano de la superficie celular. Cualquiera de los anticuerpos anteriores o fragmentos de unión a antígeno del mismo en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo induce al menos un 45 % de internalización en las células de c-Met humano de la superficie celular. Cualquiera de los anticuerpos anteriores o fragmentos de unión a antígeno del mismo en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo induce al menos un 50 % de internalización en las células de c-Met humano de la superficie celular. Cualquiera de los anticuerpos anteriores o fragmentos de unión a antígeno del mismo en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo induce al menos un 55 % de internalización en las células de c-Met humano de la superficie celular. Cualquiera de los anticuerpos anteriores o fragmentos de unión a antígeno del mismo en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo induce al menos un 60 % de internalización en las células de c-Met humano de la superficie celular. Cualquiera de los anticuerpos anteriores o fragmentos de unión a antígeno del mismo en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo induce al menos un 65 % de internalización en las células de c-Met humano. Cualquiera de los anticuerpos anteriores o fragmentos de unión a antígeno del mismo en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo induce al menos un 70 % de internalización en las células de c-Met humano de la superficie celular.

- 50 Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que induce la reducción del c-Met total en las células tumorales independientes del factor de crecimiento de hepatocitos. En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que induce reducción del c-Met total en células tumorales independientes del factor de crecimiento de hepatocitos comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 28 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 40. En otra realización

preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que induce reducción del c-Met total en células tumorales independientes del factor de crecimiento de hepatocitos comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 29 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 41.

- 5 Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que induce la reducción del c-Met fosforilado en las células tumorales independientes del factor de crecimiento de hepatocitos.

- 10 Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se une a la cadena α del c-Met humano en sustancialmente al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 28 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 40, o que se une a la cadena α del c-Met humano en sustancialmente al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 29 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 41.

- 15 Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, con exclusión de los que comprenden una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 26 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 38, en el que el epítipo comprende uno o más residuos de aminoácidos dentro de ₁₄₄HVFPNHTADIQS₁₅₆ (SEC ID N° 82) inclusive.

- 20 Uno cualquiera de los anticuerpos anteriores o fragmentos de unión a antígeno, en el que el epítipo comprende además uno o más residuos de aminoácidos dentro de ₁₂₃DTYYDD₁₂₈ (SEC ID N° 81) inclusive.

Uno cualquiera de los anticuerpos anteriores o fragmentos de unión a antígeno, en el que el epítipo comprende además uno o más residuos de aminoácidos dentro de ₁₉₂FINF₁₉₅ (SEC ID N° 83) inclusive.

Uno cualquiera de los anticuerpos anteriores o fragmentos de unión a antígeno, en el que el epítipo comprende además uno o más residuos de aminoácidos dentro de ₂₂₀KETKDGFM₂₂₇ (SEC ID N° 84) inclusive.

- 25 Uno cualquiera de los anticuerpos anteriores o fragmentos de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo se une dentro de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- a) ₁₂₁VVDYYDDQL₁₃₀ (SEC ID N° 77),
- b) ₁₃₁ISCGSVNRGTCQRHVFPNHTADIQS₁₅₆ (SEC ID N° 78),
- c) ₁₇₉ALGAKVLSSVKDRFINF₁₉₅ (SEC ID N° 79), y
- d) ₂₁₆VRRLKETKDGFM₂₂₇ (SEC ID N° 80), inclusive.

- 30

Uno cualquiera de los anticuerpos anteriores o fragmentos de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo se une dentro de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- a) ₁₂₃DTYYDD₁₂₈ (SEC ID N° 81),
- b) ₁₄₄HVFPNHTADIQS₁₅₆ (SEC ID N° 82),
- c) ₁₉₂FINF₁₉₅ (SEC ID N° 83), y
- d) ₂₂₀KETKDGFM₂₂₇ (SEC ID N° 84), inclusive.

- 35

Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión al antígeno del mismo que se unen a una secuencia de aminoácidos dentro del epítipo caracterizado por ₁₂₁VVDYYDDQL₁₄₀ (SEC ID N° 77), ₁₃₁ISCGSVNRGTCQRHVFPNHTADIQS₁₅₆ (SEC ID N° 78), ₁₇₉ALGAKVLSSVKDRFINF₁₉₅ (SEC ID N° 79), y ₂₁₆VRRLKETKDGFM₂₂₇ (SEC ID N° 80), inclusive.

- 40

Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión al antígeno del mismo que se unen a una secuencia de aminoácidos dentro del epítipo caracterizado por ₁₂₃DTYYDD₁₂₈ (SEC ID N° 81), ₁₄₄HVFPNHTADIQS₁₅₆ (SEC ID N° 82), ₁₉₂FINF₁₉₅ (SEC ID N° 83), y ₂₂₀KETKDGFM₂₂₇ (SEC ID N° 84) inclusive.

- 45 Uno cualquiera de los anticuerpos anteriores o fragmentos de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo se une dentro de una secuencia de aminoácidos de ₉₅CFPCQDCSSKA₁₀₅ (SEC ID N° 86) inclusive.

Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, con exclusión de los que comprenden una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 29 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 41, en el que el epítipo comprende uno o más residuos de aminoácidos dentro de ₉₅CFPCQDCSSKA₁₀₅ (SEC ID N° 86) inclusive.

Una cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se une a c-Met humano, que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) y tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR),

en el que dichas tres LCDR y dichas tres HCDR se seleccionan del grupo que consiste en:

- 5 a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SVSSSISSTNLH (SEC ID N° 49);
LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos GTSX₁LX₂S (SEC ID N° 87), en el que X₁ es Y o R, y X₂ es A o R;
LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQWSSYPYS (SEC ID N° 51);
HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSRYIH (SEC ID N° 59);
- 10 HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos WIYPVTGDTYYX₇EX₈FKG (SEC ID N° 90), en la que X₇ es N, 1, o R, y X₈ es K o P; y
HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos GYGAFX₉Y (SEC ID N° 91), en la que X₉ es Y o F; y
b) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SVSSSVX₃SIYLH (SEC ID N° 88), en la que X₃ es S o R;
- 15 LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEC ID N° 54);
LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos X₄X₅YX₆GYPLT (SEC ID N° 89), en la que X₄ es I o Q, X₅ es Q o V, y X₆ es S o R;
HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTDYMH (SEC ID N° 65);
- 20 HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos RVNPX₁₀RX₁₁X₁₂TTYNQKFEG (SEC ID N° 92), en la que X₁₀ es N o Y, X₁₁ es G o R, y X₁₂ es G o S; y
HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos X₁₃NX₁₄LDY (SEC ID N° 93), en el que X₁₃ es Y o R, y X₁₄ es W o 1;

- 25 en el que dicho anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un epítipo dentro de la cadena α de dicho c-Met humano e induce la internalización de c-Met humano de la superficie celular.

- Una cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se une a c-Met humano, que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) y tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR), en el que el anticuerpo comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) y tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (LCDR), en el que
- 30

- LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SVSSSISSTNLH (SEC ID N° 49);
LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos GTSX₁LX₂S (SEC ID N° 87), en el que X₁ es Y o R, y X₂ es A o R;
LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QQWSSYPYS (SEC ID N° 51);
- 35 HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSRYIH (SEC ID N° 59);
HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos WIYPVTGDTYYX₇EX₈FKG (SEC ID N° 90), en la que X₇ es N, 1, o R, y X₈ es K o P; y
HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos GYGAFX₉Y (SEC ID N° 91), en la que X₉ es Y o F.

- Una cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se une a c-Met humano, que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) y tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR), en el que
- 40

- LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SVSSSVX₃SIYLH (SEC ID N° 88); en la que X₃ es S o R;
LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEC ID N° 54);
LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos X₄X₅YX₆GYPLT (SEC ID N° 89), en la que X₄ es I o Q, X₅ es Q o V, y X₆ es S o R;
- 45

HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTDYMH (SEC ID N° 65);

HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos RVNPX₁₀RX₁₁X₁₂TTYNQKFEG (SEC ID N° 92), en la que X₁₀ es N o Y, X₁₁ es G o R, y X₁₂ es G o S; y

5 HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos X₁₃NX₁₄LDY (SEC ID N° 93), en el que X₁₃ es Y o R, y X₁₄ es W o I;

Una cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se une a c-Met humano, que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) y tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR), y

en el que dichas tres LCDR y dichas tres HCDR se seleccionan del grupo que consiste en:

- 10 a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SVSSSISSTNLH (SEC ID N° 49);
LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos GTSYLAS (SEC ID N° 50);
LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QWSSYPYS (SEC ID N° 51);
HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSRYIH (SEC ID N° 59);
HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos WIYPVTGDTYYNEKFKG (SEC ID N° 60); y
- 15 HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos GYGAFYY (SEC ID N° 61);
b) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SVSSSISSTNLH (SEC ID N° 49);
LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos GTSYLAS (SEC ID N° 50);
LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QWSSYPYS (SEC ID N° 51);
HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSRYIH (SEC ID N° 59);
- 20 HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos WIYPVTGDTYYIEKFKG (SEC ID N° 62); y
HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos GYGAFYY (SEC ID N° 63);
c) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SVSSSISSTNLH (SEC ID N° 49);
LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos GTSRLRS (SEC ID N° 52);
LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QWSSYPYS (SEC ID N° 51);
- 25 HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSRYIH (SEC ID N° 59);
HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos WIYPVTGDTYYREPFGK (SEC ID N° 64); y
HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos GYGAFYY (SEC ID N° 61);
d) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SVSSSVSSIYHL (SEC ID N° 53);
LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEC ID N° 54);
- 30 LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos IQYSGYPLT (SEC ID N° 55);
HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTDYMH (SEC ID N° 65);
HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos RVNPNRGTTYNQKFEG (SEC ID N° 66); y
HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos TNWLDY (SEC ID N° 67);
e) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SVSSSVSSIYHL (SEC ID N° 53);
- 35 LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEC ID N° 54);
LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QVYSGYPLT (SEC ID N° 56);
HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTDYMH (SEC ID N° 65);
HCDR12 que comprende la secuencia de aminoácidos RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEC ID N° 68); y

HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos ANWLDY (SEC ID N° 69); y

f) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SVSSSVRSIYLH (SEC ID N° 57);

LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEC ID N° 54);

LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QVYRGYPLT (SEC ID N° 58);

5 HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTDYMH (SEC ID N° 65);

HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos RVNPYRGSTTYNQKFEG (SEC ID N° 70); y

HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos ANILDY (SEC ID N° 71); y

en el que dicho anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un epítipo dentro de la cadena α de dicho c-Met humano e induce la internalización de c-Met humano de la superficie celular.

10 Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) y tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada se seleccionan del grupo que consiste en:

a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SVSSSISSTNLH (SEC ID N° 49);

LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos GTSYLA (SEC ID N° 50);

15 LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQWSSYPYS (SEC ID N° 51);

HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSRYIH (SEC ID N° 59);

HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos WIYPVTGDTYYNEKFKG (SEC ID N° 60); y

HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos GYGAFYY (SEC ID N° 61);

b) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SVSSSISSTNLH (SEC ID N° 49);

20 LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos GTSYLA (SEC ID N° 50);

LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQWSSYPYS (SEC ID N° 51);

HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSRYIH (SEC ID N° 59);

HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos WIYPVTGDTYYIEKFKG (SEC ID N° 62); y

HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos GYGAFYY (SEC ID N° 63);

25 c) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SVSSSISSTNLH (SEC ID N° 49);

LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos GTSRLRS (SEC ID N° 52);

LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQWSSYPYS (SEC ID N° 51);

HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTSRYIH (SEC ID N° 59);

HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos WIYPVTGDTYYREPFG (SEC ID N° 64); y

30 HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos GYGAFYY (SEC ID N° 61);

Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) y tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada en el que dichas tres HCDR se seleccionan del grupo que consiste en:

35 a) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SVSSSVSSIYLH (SEC ID N° 53);

LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEC ID N° 54);

LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos IQYSGYPLT (SEC ID N° 55);

HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTDYMH (SEC ID N° 65);

HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos RVNPNRGSTTYNQKFEG (SEC ID N° 66); y

- CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos TNWLDY (SEC ID N° 67);
- b) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SVSSSVSSIYLH (SEC ID N° 53);
- LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEC ID N° 54);
- LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QVYSGYPLT (SEC ID N° 56);
- 5 HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTDYMH (SEC ID N° 65);
- HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEC ID N° 68); y
- HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos ANWLDY (SEC ID N° 69); y
- c) LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SVSSSVRSIYLH (SEC ID N° 57);
- LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEC ID N° 54);
- 10 LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QVYRGYPLT (SEC ID N° 58);
- HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTDYMH (SEC ID N° 65);
- HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos RVNPYRGSTTYNQKFEG (SEC ID N° 70); y
- HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos ANILDY (SEC ID N° 71).
- 15 Una cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) y tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR), en el que:
- LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SVSSSVSSIYLH (SEC ID N° 53);
- LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEC ID N° 54);
- LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos IQYSGYPLT (SEC ID N° 55);
- 20 HCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTDYMH (SEC ID N° 65);
- HCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEC ID N° 66); y
- HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos TNWLDY (SEC ID N° 67);
- Una cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) y tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR), en el que:
- 25 LCDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SVSSSVSSIYLH (SEC ID N° 53);
- LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEC ID N° 54);
- LCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QVYSGYPLT (SEC ID N° 56);
- HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTDYMH (SEC ID N° 65);
- 30 HCDR12 que comprende la secuencia de aminoácidos RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEC ID N° 68); y
- HCDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos ANWLDY (SEC ID N° 69); y
- Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores, o fragmentos de unión a antígeno los mismos, que comprende una región variable de la cadena ligera (LCVR) y una región variable de la cadena pesada (HCVR), en el que dicha LCVR y dicha HCVR, respectivamente, comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:
- 35 a) SEC ID N° 94 y SEC ID N° 96; y
- b) SEC ID N° 95 y SEC ID N° 97,
- en el que dicho anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un epítipo dentro de la cadena α de dicho c-Met humano e induce la internalización de c-Met humano de la superficie celular.
- 40 Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden una región variable de la cadena ligera (LCVR) y una región variable de la cadena pesada (HCVR), en

el que dicha LCVR comprende la SEC ID N° 94 y dicha HCVR comprende la SEC ID N° 96.

Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden una región variable de la cadena ligera (LCVR) y una región variable de la cadena pesada (HCVR), en el que dicha LCVR comprende la SEC ID N° 95 y dicha HCVR comprende la SEC ID N° 97.

5 Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, en el que dicha LCVR y dicha HCVR comprenden secuencias de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) LCVR es SEC ID N° 1 y HCVR es SEC ID N° 13;
- b) LCVR es SEC ID N° 2 y HCVR es SEC ID N° 14;
- 10 c) LCVR es SEC ID N° 3 y HCVR es SEC ID N° 15;
- d) LCVR es SEC ID N° 4 y HCVR es SEC ID N° 16;
- e) LCVR es SEC ID N° 5 y HCVR es SEC ID N° 17; y
- f) LCVR es SEC ID N° 6 y LCVR es SEC ID N° 18;

15 Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, en el que dicha LCVR y dicha HCVR, respectivamente, comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

- a) LCVR es SEC ID N° 1 y HCVR es SEC ID N° 13;
- b) LCVR es SEC ID N° 2 y HCVR es SEC ID N° 14; y
- c) LCVR es SEC ID N° 3 y HCVR es SEC ID N° 15.

20 Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, en el que dicha LCVR y dicha HCVR, respectivamente, comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

- a) LCVR es SEC ID N° 4 y HCVR es SEC ID N° 16;
- b) LCVR es SEC ID N° 5 y HCVR es SEC ID N° 17; y

25 c) LCVR es SEC ID N° 6 y HCVR es SEC ID N° 18.

Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, en el que dicha LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 4 y dicha HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 16.

30 Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, en el que dicha LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 5 y dicha HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 17.

Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores en el que dicho anticuerpo comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera y la cadena pesada comprenden secuencias de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- 35 a) la cadena ligera es la SEC ID N° 25 y la cadena pesada es la SEC ID N° 37;
- b) la cadena ligera es la SEC ID N° 26 y la cadena pesada es la SEC ID N° 38;
- c) la cadena ligera es la SEC ID N° 27 y la cadena pesada es la SEC ID N° 39;
- d) la cadena ligera es la SEC ID N° 28 y la cadena pesada es la SEC ID N° 40;
- e) la cadena ligera es la SEC ID N° 29 y la cadena pesada es la SEC ID N° 41; y
- 40 f) la cadena ligera es la SEC ID N° 30 y la cadena pesada es la SEC ID N° 42.

Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores en el que dicho anticuerpo comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera y la cadena pesada comprenden secuencias de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) la cadena ligera es la SEC ID N° 25 y la cadena pesada es la SEC ID N° 37;

b) la cadena ligera es la SEC ID N° 26 y la cadena pesada es la SEC ID N° 38; y

c) la cadena ligera es la SEC ID N° 27 y la cadena pesada es la SEC ID N° 39.

Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores en el que dicho anticuerpo comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera y la cadena pesada comprenden secuencias de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

a) la cadena ligera es la SEC ID N° 28 y la cadena pesada es la SEC ID N° 40;

b) la cadena ligera es la SEC ID N° 29 y la cadena pesada es la SEC ID N° 41; y

c) la cadena ligera es la SEC ID N° 30 y la cadena pesada es la SEC ID N° 42.

Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores, en el que dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 28 y dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 40.

Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores, en el que dicha cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 29 y dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 41.

Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores, en el que dicho anticuerpo comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en el que cada cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 28 y dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 40.

Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores, en el que dicho anticuerpo comprende dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, en el que cada cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 29 y dicha cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 41.

Un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que compite con cualquiera de los anticuerpos monoclonales frente a c-Met anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos para la unión a c-Met. Tal anticuerpo monoclonal que compite o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede unir al mismo epítipo de c-Met que uno cualquiera de los anteriores anticuerpos monoclonales frente a c-Met o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo compite con un anticuerpo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 28 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 40. En otra realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo compite con un anticuerpo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 29 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 41.

Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que induce la reducción del c-Met total humano y c-Met humano fosforilado en las células tumorales independientes del factor de crecimiento de hepatocitos que sobreexpresan de forma constitutiva dicho c-Met humano. En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que induce reducción del c-Met total humano y el c-MET humano fosforilado en células tumorales independientes del factor de crecimiento de hepatocitos que sobreexpresan de forma constitutiva dicho c-Met humano, comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 28 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 40. En otra realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que induce reducción del c-Met total humano y c-Met humano fosforilado en células tumorales independientes del factor de crecimiento de hepatocitos que sobreexpresan de forma constitutiva dicho c-Met humano comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 29 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 41.

Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que induce la reducción del c-Met total humano y c-Met humano fosforilado en las células tumorales independientes del factor de crecimiento de hepatocitos que fosforilan de forma constitutiva dicho c-Met humano. En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que induce reducción del c-Met total humano y el c-MET humano fosforilado en células tumorales independientes del factor de crecimiento de hepatocitos que fosforilan de forma constitutiva dicho c-Met humano, comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 28 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 40. En otra realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que induce reducción del c-Met total humano y c-Met humano fosforilado en células tumorales independientes del factor de crecimiento de hepatocitos que fosforilan de forma constitutiva dicho c-Met humano comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 29 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 41.

Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que

induce la reducción del c-Met total humano y c-Met humano fosforilado en las células tumorales independientes del factor de crecimiento de hepatocitos que son respondedores al factor de crecimiento de hepatocitos.

- 5 Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se une preferentemente al dominio extracelular de c-Met humano en comparación con el dominio extracelular de RON humano RON o el dominio extracelular de Plexina A2 humana.

- 10 Cualquiera de los anteriores anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que no induce desprendimiento del dominio extracelular de c-Met humano. En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que no induce desprendimiento del dominio extracelular de c-Met humano comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 28 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 40. En otra realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que no induce desprendimiento del dominio extracelular de c-Met humano comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 29 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 41.

- 15 Uno cualquiera de los anteriores anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que no protege a las células tumorales que expresan c-Met de la apoptosis inducida por estaurosporina. En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que no que no protege a las células tumorales que expresan c-Met de la apoptosis inducida por estaurosporina comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 28 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 40. En otra realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que no que no protege a las células tumorales que expresan c-Met de la apoptosis inducida por estaurosporina comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 29 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 41.

- 25 Uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que inhibe la proliferación independiente del factor de crecimiento de c-Met humano.

Uno cualquiera de los anteriores anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que inhibe la unión del factor de crecimiento de hepatocitos humano al c-Met humano.

- 30 Uno cualquiera de los anteriores anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que no induce actividades agonistas biológicas similares a HGF. Las actividades agonistas biológicas similares a HGF incluyen la proliferación de células tumorales, la motilidad de las células tumorales, la invasión de las células tumorales, la tubulogénesis, la angiogénesis, y los efectos anti-apoptóticos. En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que no induce actividades agonistas biológicas similares a HGF, comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 29 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 41.

Una composición farmacéutica, que comprende uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 40 Uno cualquiera de los anteriores anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno del mismo para uso en terapia. En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso en terapia comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 28 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 40. En otra realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso en terapia comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 29 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 41.

- 50 Uno cualquiera de los anteriores anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno del mismo para uso en el tratamiento de un cáncer en un ser humano. En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso en el tratamiento de un cáncer en un ser humano comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 28 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 40. En otra realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso en el tratamiento de un cáncer en un ser humano comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 29 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 41.

- 55 Uno cualquiera de los anteriores anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno del mismo para uso en el tratamiento de un cáncer en un ser humano en combinación con otro agente terapéutico. En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso en el tratamiento de un cáncer en un ser humano en combinación con otro agente terapéutico comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 28 y la cadena pesada

comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 40. En otra realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo para uso en el tratamiento de un cáncer en un ser humano en combinación con otro agente terapéutico comprende una cadena ligera y una cadena pesada, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 29 y la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 41.

Una composición farmacéutica, que comprende uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Uso de uno cualquiera de los anteriores anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno del mismo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer en un ser humano.

- 10 Un procedimiento de tratamiento de un cáncer, que comprende administrar a un paciente humano en necesidad del mismo una cantidad eficaz de uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales anteriores o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

Definiciones

- 15 Un anticuerpo de longitud completa tal como existe en la naturaleza, es una molécula de inmunoglobulina que comprende 2 cadenas pesadas (H) y 2 cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento del antígeno través de la regiones determinantes de la complementariedad (CDR) contenidas en el mismo. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora.

- 20 Las CDR están intercaladas con regiones que están más conservadas denominadas regiones estructurales, marco ("FR"). Cada región variable de la de cadena ligera (LCVR) y región variable de la cadena pesada (HCVR) se compone de 3 CDR y 4 FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las 3 CDR de la cadena ligera se denominan "LCDR1, LCDR2 y LCDR3" y las 3 CDR de la cadena pesada se denominan "HCDR1, H CDR2, y HCDR3". Las CDR contienen la
25 mayor parte de los residuos que forman interacciones específicas con el antígeno. La numeración y el posicionamiento de los residuos de aminoácidos de las CDR dentro de las regiones LCVR y HCVR están de acuerdo con la convención de numeración de Kabat bien conocida.

- Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda, y se caracterizan por una región constante particular, como se conoce en la técnica. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, y definen el
30 isótopo del anticuerpo como IgG una, IgM, IgA, IgD, o IgE, respectivamente. Los anticuerpos IgG pueden dividirse además en subclases, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Cada tipo de cadena pesada se caracteriza por una región constante en particular con una secuencia bien conocida en la técnica.

- Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpo monoclonal" (Mab) como se aplica a los presentes compuestos de anticuerpo se refiere a un anticuerpo que se deriva de una sola copia o clon que incluye,
35 por ejemplo, cualquier clon eucariota, procariota, o fago, y no el procedimiento por el cual se produce. Los Mab de la presente invención existen preferiblemente en una población homogénea o sustancialmente homogénea. Los Mab completos contienen 2 cadenas pesadas y 2 cadenas ligeras. Los "fragmentos de unión a antígeno" de tales anticuerpos monoclonales incluyen, por ejemplo, fragmento Fab, los fragmentos Fab', los fragmentos F(ab')₂, los fragmentos Fv de cadena sencilla, y anticuerpos de un solo brazo que comprenden una cadena ligera y una cadena pesada. Los anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención se
40 pueden producir, por ejemplo, mediante tecnologías recombinantes, tecnologías de expresión en fagos, tecnologías sintéticas, por ejemplo, injerto de CDR, o combinaciones de tales tecnologías, u otras tecnologías conocidas en la técnica.

- "Compuestos de anticuerpo" se refiere a los Mab y Fab divulgados en el presente documento. Los compuestos de anticuerpos adicionales que presentan propiedades funcionales similares de acuerdo con la presente invención se
45 pueden generar por procedimientos convencionales. Por ejemplo, los ratones pueden inmunizarse con c-Met humano o fragmentos de los mismos, los anticuerpos resultantes pueden recuperarse y purificarse, y la determinación de si poseen propiedades de unión y funcionales similares a o las mismas que los compuestos de anticuerpos divulgados en el presente documento pueden evaluarse por Los procedimientos divulgados en los
50 Ejemplos 2-19, a continuación. Los fragmentos de unión a antígeno también se pueden preparar por procedimientos convencionales. Los procedimientos para producir y purificar anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno son bien conocidos en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, capítulos 5 – 8 y 15, ISBN 0-87969-314-2.

- 55 La expresión "anticuerpos manipulados humanos" se refiere a anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno, además de los compuestos de anticuerpos divulgados en el presente documento que tienen propiedades de unión y funcionales de acuerdo con la invención similares a las divulgados en el presente documento, y que tienen regiones marco que son sustancialmente humanas o completamente humanas que rodean a las CDR

derivadas de un anticuerpo no humano. "Región marco" o "secuencia marco" se refiere a una cualquiera de las regiones marco 1 a 4. Los anticuerpos humanos manipulados y fragmentos de unión a antígeno abarcados por la presente invención incluyen moléculas en las que una cualquiera o más de las regiones marco 1 a 4 es sustancialmente o completamente humana, es decir, en la que cualquiera de las posibles combinaciones de las regiones marco individuales sustancialmente o completamente humanas 1 a 4, está presente. . Por ejemplo, esto incluye moléculas en las que la región marco 1 y la región marco 2, la región marco 1 y la región marco 3, la región marco 1, 2, y 3, etc. son sustancialmente o totalmente humanas. Los marcos sustancialmente humanos son aquellos que tienen al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia con una secuencia marco de la línea germinal humana conocida. Preferiblemente, los marcos sustancialmente humanos tienen al menos aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, o aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de marco de la línea germinal humana conocida.

Los marcos completamente humanos son aquellos que son idénticos a una secuencia marco de la línea germinal humana conocida. Las secuencias de la línea germinal marco humanas pueden obtenerse de ImMunoGeneTics (IMGT) mediante su sitio web <http://imgt.cines.fr>, o de *The Immunoglobulin FactsBook* de Marie-Paule Lefranc y Gerard Lefranc, Academic Press, 2001, ISBN 012441351. Por ejemplo, los marcos de la cadena ligera de la línea germinal se pueden seleccionar de entre el grupo que consiste en: A11, A17, A18, A19, A20, A27, A30, LI, L11, L12, L2, L5, L15, L6, L8, O12, O2, y O8, y las regiones marco de la cadena pesada de la línea germinal se pueden seleccionar de entre el grupo que consiste en: VH2-5, VH2-26, VH2-70, VH3-20, VH3-72, VH1-46, VH3-9, VH3-66, VH3-74, VH4-31, VH1-18, VH1-69, V1-13-7, VH3-11, VH3-15, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-48, VH4-39, VH4-59, y VH5-51.

Los anticuerpos manipulados humanos, además de los divulgados en el presente documento exhiben propiedades funcionales similares de acuerdo con la presente invención pueden generarse usando varios procedimientos diferentes. En un enfoque, las CDR del compuesto del anticuerpo parental se injertan en un marco humano que tiene una alta identidad de secuencia con el marco del compuesto del anticuerpo parental. La identidad de secuencia del nuevo marco será generalmente de al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, o al menos aproximadamente 99 % idéntica a la secuencia del marco correspondiente en el compuesto anticuerpo parental. En el caso de los marcos que tienen menos de 100 residuos de aminoácidos, uno, dos, o tres residuos de aminoácidos se pueden cambiar. Este injerto puede resultar en una reducción en la afinidad de unión en comparación con la del anticuerpo parental. Si este es el caso, el marco puede retromutarse al marco de parental en ciertas posiciones sobre la base de criterios específicos divulgados por Queen et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2869. Referencias adicionales que describen procedimientos útiles en la humanización de anticuerpos de ratón incluyen las patentes de EE.UU. N° 4.816.397; 5.225.539, y 5.693.761; programas de ordenador ABMOD y ENCAD como se describe en Levitt (1983) *J. Mol. Biol.* 168:595 – 620; y el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones et al. (1986) *Nature* 321:522 – 525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323 – 327; y Verhoeven et al. (1988) *Science* 239:1534 – 1536.

La identificación de los residuos a considerar para la retromutación se puede llevar a cabo como sigue.

Cuando un aminoácido cae bajo la siguiente categoría, el aminoácido marco de la secuencia de la línea germinal humana que se está utilizando (el "marco aceptor") se sustituye por un aminoácido marco de un marco del compuesto anticuerpo parental (el "marco donante").

(a) el aminoácido en la región marco humana del marco aceptor es inusual para marcos humana en esa posición, mientras que el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante es típico para los marcos humana en esa posición;

(b) la posición del aminoácido es inmediatamente adyacente a uno de los CDR; o

(c) cualquier átomo de la cadena lateral de un aminoácido marco está a unos 5-6 ángstrom (de centro a centro) de cualquier átomo de un aminoácido de CDR en un modelo de inmunoglobulina tridimensional.

Cuando cada uno de los aminoácidos en la región marco humana del marco aceptor y un aminoácido correspondiente en el marco donante es generalmente inusual para marcos humana en esa posición, tal aminoácido puede reemplazarse por un aminoácido típico para marcos humanos en esa posición. Este criterio de retromutación permite recuperar la actividad del compuesto anticuerpo parental.

Otro enfoque para la generación de anticuerpos humanos manipulados que presentan propiedades funcionales similares a las de los compuestos de anticuerpos divulgados en el presente documento implica la mutación al azar de aminoácidos dentro de las CDR injertadas sin cambiar el marco, y cribar las moléculas resultantes para la afinidad y otras propiedades funcionales de unión que son tan buenos o mejores que las de los compuestos anticuerpo parental. Las mutaciones individuales también pueden introducirse en cada posición de aminoácido dentro de cada CDR, seguido de la evaluación de los efectos de dichas mutaciones en la afinidad de unión y otras propiedades funcionales. Las mutaciones individuales que producen propiedades mejoradas se pueden combinar para evaluar sus efectos en combinación entre sí.

Además, una combinación de ambos de los enfoques anteriores es posible. Después del injerto de CDR, se pueden

retromutar regiones marco específicas además de introducir cambios de aminoácidos en las CDR. Esta metodología se describe en Wu et al. (1999) J. Mol. Biol. 294:151 – 162.

Aplicando las enseñanzas de la presente invención, una persona experta en la técnica puede utilizar las técnicas comunes, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio, para sustituir los aminoácidos dentro de las secuencias marco actualmente divulgadas y de ese modo generar secuencias de aminoácidos de la región variable adicionales derivada de la secuencias presentes. Hasta todos los aminoácidos de origen natural se puede introducir en un sitio de la sustitución específica. Los procedimientos divulgados en el presente documento pueden usarse para detectar estas secuencias de aminoácidos de la región variables adicionales para identificar secuencias que tienen las funciones *in vivo* indicadas. De esta manera, pueden identificarse otras secuencias adecuadas para la preparación de anticuerpos humanos de ingeniería y las porciones de unión a antígeno de los mismos de acuerdo con la presente invención. Preferiblemente, la sustitución de aminoácidos dentro de los marcos está restringida a una, dos, o tres posiciones dentro de uno cualquiera o más de las 4 regiones marco de la cadena ligera y/o la cadena pesada divulgadas en el presente documento. Preferiblemente, la sustitución de aminoácidos dentro de las CDR está restringida a una, dos, o tres posiciones dentro de uno cualquiera o más de las 3 CDR de la cadena ligera y/o la cadena pesada. Las combinaciones de los diversos cambios dentro de estas regiones estructurales y CDR descritas anteriormente también son posibles.

Que las propiedades funcionales de los compuestos de anticuerpos generados mediante la introducción de las modificaciones de aminoácidos descritas anteriormente se ajustan a las exhibidas por las moléculas específicas divulgadas en el presente documento puede confirmarse por los procedimientos descritos a continuación en los Ejemplos 2-19.

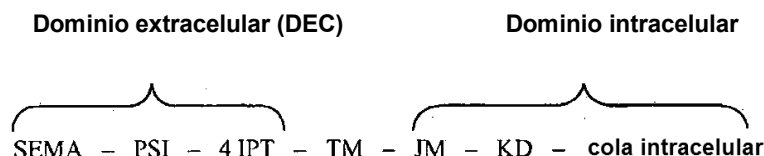
El término "epítipo" se refiere a una disposición específica de los aminoácidos situados en un péptido o proteína a la que un anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une. Los epítipos a menudo consisten en grupos de superficie químicamente de moléculas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen características estructurales tridimensionales, así como características de carga específicas. Los epítipos pueden ser lineales, es decir, implican la unión a una única secuencia de aminoácidos, o conformacional, es decir, que implica la unión a dos o más secuencias de aminoácidos en varias regiones del antígeno que puede no ser necesariamente contiguos. Los epítipos divulgados en el presente documento puede consistir en, consisten esencialmente en, o comprenden las secuencias de aminoácidos divulgadas en el Ejemplo 3.

Los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que "compiten" con las moléculas divulgadas en este documento son aquellos que se unen a c-Met humano en el o los sitio (s) que son idénticas a, o se solapan con, el sitio (s) a la que las presentes moléculas se unen. Los anticuerpos monoclonales de competición o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se pueden identificar mediante un ensayo de competición de anticuerpos. Por ejemplo, una muestra de c-Met humano purificado o parcialmente purificado puede estar unido a un soporte sólido. Luego, se añaden un compuesto de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de la presente invención y un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo sospechoso de ser capaz de competir con tal compuesto anticuerpo de la invención. Una de las dos moléculas está marcada. Si el compuesto marcado y el compuesto no marcado se unen a sitios discretos y separados en c-Met, el compuesto marcado se unirá al mismo nivel haya o no presente el compuesto que de competición sospechoso. Sin embargo, si los sitios de interacción son idénticos o solapantes el compuesto no marcado competirá, y la cantidad de compuesto marcado unido al antígeno se reducirá. Si el compuesto no marcado está presente en exceso, muy poco, si algo, del compuesto marcado se unirá. Para los propósitos de la presente invención, los anticuerpos monoclonales que compiten o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son los que disminuyen la unión de los presentes compuestos anticuerpos frente a c-Met en aproximadamente un 50 %, aproximadamente 60%, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, o aproximadamente 99 %. Los detalles de los procedimientos para llevar a cabo tales ensayos de competición son bien conocidos en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, capítulos 567 – 569 y 15, ISBN 0-87969-314-2. Tales ensayos pueden hacerse cuantitativos mediante el uso de anticuerpos purificados. Una curva estándar se establece por valoración de un anticuerpo contra sí mismo, es decir, el mismo anticuerpo se utiliza tanto como marcador como competidor. Se valora la capacidad de un anticuerpo monoclonal no marcado que compite o fragmento de unión a antígeno del mismo para inhibir la unión de la molécula marcada a la placa. Se comparan los resultados se representan, y las concentraciones necesarias para alcanzar el grado deseado de inhibición de la unión. Si los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que compiten con los compuestos de anticuerpo de la presente invención en tales ensayos de competición poseen las mismas o similares propiedades funcionales de los presentes compuestos de anticuerpos se puede determinar a través de los procedimientos divulgados en los Ejemplos 2-19 del presente documento.

Los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen sustancialmente al mismo epítipo (s) de c-Met que los anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno divulgados en el presente documento son aquellos que se unen a c-Met humano en el sitio (s) que se superponen con el o los sitios en el que los presentes moléculas se unen. Los procedimientos que facilitan la identificación de anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen sustancialmente al mismo epítipo de c-Met que los anticuerpos monoclonales c-Met o fragmentos de unión a antígeno divulgados en el presente

documento son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la publicación internacional PCT WO 00/64946. Si tales anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen sustancialmente al mismo epítipo(s) de c-Met que los divulgados en el presente documento poseen las mismas o similares propiedades funcionales de los presentes compuestos de anticuerpos se puede determinar a través de los procedimientos divulgados en los Ejemplos 2-19 en el presente documento.

"c-Met" o " c-Met humano" se refiere a cualquier c-Met humano, así como formas mutadas funcionalmente activas de los mismos. La estructura del c-Met se representa esquemáticamente como:



SEMA: dominio Sema

PSI: dominios de plexina, semaforinas e integrinas

IPT: 4 Inmunoglobulinas, Plexinas, y los dominios del factor de transcripción

TM: región transmembrana

JM: dominio yuxtamembranal

KD: dominio cinasa

En el DEC de c-Met humano (SEC ID N° 75), los aminoácidos 1-24 comprenden la secuencia señal. La proteína madura comienza en el aminoácido 25 (E). dominio Sema consta de aproximadamente 500 residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal de c-Met, y contiene la cadena α (residuos de aminoácidos 25 a 307) y parte de la cadena β (residuos de aminoácidos 308 a 519).

El término "inhibir" significa la capacidad para antagonizar sustancialmente, prohibir, prevenir, frenar, ralentizar, interrumpir, eliminar, detener, reducir o invertir los efectos biológicos de c-Met.

El término "que trata" (o "tratar" o "tratamiento") significa ralentizar, interrumpir, detener, controlar, parar, reducir o invertir la progresión o gravedad de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad, pero no implica necesariamente una eliminación total de todos los síntomas, afecciones o trastornos relacionados con la enfermedad.

Los acontecimientos agudos y las enfermedades crónicas se pueden tratar. En un acontecimiento agudo, se administra un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo al inicio de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad, y se interrumpe cuando termina el acontecimiento agudo. En contraste, un síntoma crónico, trastorno, afección o enfermedad es tratada durante un período de tiempo más prolongado.

El término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad o dosis de un compuesto de anticuerpo de la presente invención que, tras la administración de una sola dosis o de múltiples dosis a un paciente, proporciona el tratamiento o la prevención deseadas. Las cantidades terapéuticamente efectivas de los presentes compuestos de anticuerpos pueden comprender una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg / kg a aproximadamente 20 mg / kg por dosis única. Una cantidad terapéuticamente eficaz para cualquier paciente individual puede determinarla el proveedor de la atención sanitaria mediante la supervisión del efecto de los compuestos anticuerpos sobre un biomarcador, tal como c-Met de la superficie celular en los tejidos tumorales o no tumorales, regresión del tumor, etc. El análisis de los datos obtenidos por estos procedimientos permite la modificación del régimen de tratamiento durante la terapia de modo que se administren cantidades óptimas de los compuestos de anticuerpos, se usen solos o en combinación con otro agente terapéutico, y de modo tal que la duración del tratamiento se pueda determinar como bien. De esta manera, el régimen de dosificación / tratamiento puede modificarse en el transcurso de la terapia de manera que se administran las cantidades más bajas de compuestos anticuerpos utilizados solos o en combinación que presentan una eficacia reductora del tumor satisfactoria, por lo que la administración de tales compuestos solo continúa el tiempo que sea necesario para tratar con éxito al paciente.

Los compuestos de anticuerpo de la presente invención pueden utilizarse como medicamentos en la medicina humana, administrados por diversas vías. Lo más preferentemente, dichas composiciones son para administración parenteral. Tales composiciones farmacéuticas se pueden preparar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practise of Pharmacy, 19ª ed. (1995), A. Gennaro et al., Mack Publishing Co., y comprenden uno o más compuestos de anticuerpos divulgados en el presente documento, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

El término "tumor" se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sea maligno o benigno, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso" y "tumor" no son mutuamente excluyentes, como se usan en el presente documento.

- 5 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento/proliferación celular aberrante. Los ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, carcinomas, linfomas, blastomas, sarcomas, y leucemias.

c-Met y Cáncer

- 10 Las células de c-Met con regulación alterada pueden inducirse por regulación por aumento de la transcripción, amplificación del gen c-Met, alteraciones genéticas específicas, o mecanismos autocrinos o paracrinos dependientes de ligando. La causa más frecuente de la activación constitutiva de c-Met en tumores humanos es la expresión de proteínas incrementada como consecuencia de la regulación positiva de la transcripción en ausencia de amplificación del gen. Además, la amplificación de del gen MET, con la consiguiente sobreexpresión proteica y la activación constitutiva de la cinasa, se ha notificado en una serie de tumores primarios humanos, incluidos los carcinomas gástricos y esofágicos, de pulmón de células no pequeñas (NSCL), carcinomas y meduloblastomas. Los tumores de origen mesenquimal, tales como osteosarcomas y rhabdomyosarcomas, a menudo utilizan mecanismos autocrinos mediante la producción de HGF. Los niveles elevados de HGF y la sobreexpresión de c-Met se asocian a menudo con pobres resultados clínicos que incluyen enfermedad más agresiva, el aumento de la metástasis tumoral y la supervivencia del paciente más corta. Además, los altos niveles de HGF y / o proteínas c-Met en los tumores confieren resistencia a la quimioterapia y la radioterapia. Además del HGF anormal y la expresión de c-Met, la vía de c-Met se puede activar a través de alteraciones genéticas, tales como mutaciones c-Met, amplificación de genes, y reordenamiento genómico. Se encuentran mutaciones de sentido erróneo de *c-MET* en todos los individuos con carcinomas de células renales papilares hereditarios (PRCC) bien caracterizados y en un pequeño subgrupo (13 %) de muestras de PRCC esporádico. Algunas de las mutaciones poseen potencial oncogénico debido al aumento de la actividad quinasa. La trisomía del cromosoma 7, en la que residen los genes *HGF* y *c-MET*, se produce con frecuencia en PRCC, y da como resultado la duplicación no aleatoria del alelo de *c-MET* mutante. Además, han identificado mutaciones somáticas de *c-MET* en otros cánceres humanos, incluyendo cánceres gástrico, de cabeza y cuello, de hígado, de ovarios, de pulmón no microcítico y de tiroides, así como en las metástasis de algunos de estos tipos de cáncer. A diferencia del PRCC, en el que las mutaciones normalmente están limitadas al dominio quinasa, estas mutaciones se encuentran a menudo en otras regiones del receptor, por ejemplo, el dominio yuxtamembranal. Además de la mutación, el gen *c-MET* a menudo está amplificado en los cánceres de mama, hígado, cerebro, colorrectal, gástrico, de pulmón y de estómago, que se correlaciona con la progresión de la enfermedad en algunos pacientes.

Indicaciones terapéuticas

- 35 La señalización aberrante de HGF / c-MET se ha documentado en una amplia gama de neoplasias malignas humanas, incluyendo los cánceres de vejiga, de mama, cervical, colorrectal, de endometrio, esófago, gástrico, de cabeza y cuello, de riñón, de hígado, de pulmón, nasofaríngeo, de ovarios, de páncreas, de próstata y de tiroides, así como colangiocarcinoma, osteosarcoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma sinovial, sarcoma de Kaposi, leiomyosarcomas, y MFH / fibrosarcoma. Además, la expresión anormal de HGF anormal y / o c-Met también se ha descrito en neoplasias malignas hematológicas tales como leucemia mieloide aguda, leucemia de células T del adulto, leucemia mieloide crónica, linfomas y mieloma múltiple, así como otros tumores tales como melanoma, mesotelioma, tumor de Wilms, glioblastoma y astrocitomas (resumidos en Liu et al. (2008) Expert Opin. Investig. Drugs 17(7):997 – 1011). Los anticuerpos de c-Met de la presente invención pueden inhibir los tumores dependientes de HGF y e independientes de HGF.

Los ejemplos siguientes no limitantes ilustran varios aspectos de la presente invención.

- 45 En los siguientes ejemplos, los anticuerpos control IgG2 e IgG4 humanizados e IgG murino (también denominado a veces mIgG1) son anticuerpos de control de isotipo no relacionados con los presentes anticuerpos de c-Met. Los anticuerpos C8, D 11 y optD11 son anticuerpos murinos. En todos los casos, el HGF humano se obtiene de R&D Systems (#294).

Ejemplo 1

50 Anticuerpos frente a c-Met

- Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada. Las cadenas ligera y pesada completas y las respectivas secuencias de nucleótidos codificantes de los anteriores, de los presentes anticuerpos humanos manipulados se enumeran a continuación en la sección titulada "Secuencias de aminoácidos y nucleótidos". Las secuencias de aminoácidos de las CDR de la cadena ligera y la cadena pesada se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1. CDR de la cadena ligera

Anticuerpo	CDR 1	CDR 2	CDR 3
D11-S17Y	SVSSSISSTNLH (SEC ID N° 49)	GTSYLAS (SEC ID N° 50)	QQWSSYPYS (SEC ID N° 51)
D11-8B8	SVSSSISSTNLH (SEC ID N° 49)	GTSYLAS (SEC ID N° 50)	QQWSSYPYS (SEC ID N° 51)
D11-C27G3	SVSSSISSTNLH (SEC ID N° 49)	GTSRLRS (SEC ID N° 52)	QQWSSYPYS (SEC ID N° 51)
Secuencia consenso de D11	—	GTSX ₁ LX ₂ S (SEC ID N° 87)	—
C8-6	SVSSSVSSIYLH (SEC ID N° 53)	STSNLAS (SEC ID N° 54)	IQYSGYPLT (SEC ID N° 55)
C8-H241	SVSSSVSSIYLH (SEC ID N° 53)	STSNLAS (SEC ID N° 54)	QVYSGYPLT (SEC ID N° 56)
C8-co-16	SVSSSVRSIYLH (SEC ID N° 57)	STSNLAS (SEC ID N° 54)	QVYRGYPLT (SEC ID N° 58)
Secuencia consenso de C8	SVSSSVX ₃ SIYLH (SEC ID N° 88)	—	X ₄ X ₅ YX ₆ GYPLT (SEC ID N° 89)
X₁ es Y o R, y X₂ es A o R; X₃ es S o R; X₄ es I o Q, X₅ es Q o V, y X₆ es S o R;			

Tabla 2. CDR de la cadena pesada

Anticuerpo	CDR 1	CDR 2	CDR 3
D11-S17Y	GYTFTSRYIH (SEC ID N° 59)	WIYPVTGDTYYNEKFKG (SEC ID N° 60)	GYGAFYY (SEC ID N° 61)
D11-8B8	GYTFTSRYIH (SEC ID N° 59)	WIYPVTGDTYYIEKFKG (SEC ID N° 62)	GYGAFFY (SEC ID N° 63)
D11-C27G3	GYTFTSRYIH (SEC ID N° 59)	WIYPVTGDTYYREPFGK (SEC ID N° 64)	GYGAFYY (SEC ID N° 61)
Secuencia consenso de D11	—	WIYPVTGDTYYX ₇ EX ₈ FKG (SEC ID N° 90)	GYGAFX ₉ Y (SEC ID N° 91)
C8-6	GYTFTDYYMH (SEC ID N° 65)	RVNPNRGGTTYNQKFEG (SEC ID N° 66)	TNWLDY (SEC ID N° 67)

Anticuerpo	CDR 1	CDR 2	CDR 3
C8-H241	GYTFTDYMH (SEC ID N° 65)	RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEC ID N° 68)	ANWLDY (SEC ID N° 69)
C8-co-16	GYTFTDYMH (SEC ID N° 65)	RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEC ID N° 70)	ANILDY (SEC ID N° 71)
Secuencia consenso de C8	—	RVNPX ₁₀ RX ₁₁ X ₁₂ TTYNQKFEG (SEC ID N° 92)	X ₁₃ NX ₁₄ LDY (SEC ID N° 93)
X ₇ es N, I, o R, y X ₈ es K o P; X ₉ es Y o F; X ₁₀ es N o Y, X ₁₁ es G o R, y X ₁₂ es G o S; X ₁₃ es T o A, y X ₁₄ es W o I;			

Las secuencias consenso para las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo D11- y C8 son:

D11– Secuencia consenso de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo (SEC ID N° 94)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCSVSSSISSTNLHWYQKPGQAPRLLIY
GTSX₁LX₂SGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQWSSYPYSFG
QGKLEIK

5 en la que X₁ es Y o R, y X₂ es A o R;

C8– Secuencia consenso de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo (SEC ID N° 95)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSSVX₃SIYLHWYQKPGKAPKLLIY
STSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCX₄X₅YX₆GYPLTFG
GGTKVEIK

en la que X₃ es S o R, X₄ es I o Q, X₅ es Q, o V, y X₆ es S o R;

D11– Secuencia consenso de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo (SEC ID N° 96)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYFTSRVHWVRQAPGQGLEWMGW
IYPVTGDTYYX₇EX₈FKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDFAVYYCARGY
GAFX₉YWGQGLTVTS

10

en la que X₇ es N, I, o R, X₈ es K o P, y X₉ es Y o F;

C8– Secuencia consenso de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo (SEC ID N° 97)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYFTDYMHVVRQAPGQGLEWMGR
VNPX₁₀RX₁₁X₁₂TTYNQKFEGRVMTTDTSTSTAYMELSLRSDDTAVYYCARX₁₃
NX₁₄LDYWGQGLTVTS

en la que X₁₀ es Y o N, X₁₁ es G o R, X₁₂ es S o G, X₁₃ es A o T, y X₁₄ es I o W.

15 Los anticuerpos se expresan transitoriamente en las células HEK293 EBNA (Edge BioSystems, # 90500130) utilizando procedimientos de transfección estándar. Las células transfectadas se cultivan en medio libre de suero estándar que contiene geneticina (G418) y tobramicina durante de 48 a 120 horas a 37 °C después de la transfección. Los anticuerpos se purificaron en una columna de 60 ml de rProteína A Sepharose (Amersham Biosciences, # 17-1279-04) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se concentraron y se purificaron
20 adicionalmente por cromatografía de exclusión por tamaño (XK50 / 60 Superdex200, Pharmacia) con solución salina

tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4, como la fase móvil. Los anticuerpos de filtran después utilizando membranas de PVDF Millev-GV, de 0,22 m, 33 mm, (Millipore, # SLGV033RS), y se almacenaron a de 4 a 8 °C.

El anticuerpo IgG1 c-Met murino 5D5 (patente de EE.UU. N° 5.686.292) tratado en muchos de los ejemplos siguientes, se aísla y purifica a partir del hibridoma HB-11895 obtenido de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA, como se describió anteriormente.

Ejemplo 2

Cinética de unión de los anticuerpos de c-Met a varios dominios extracelulares de c-Met

Los dominios extracelulares (DEC) de las secuencias de c-Met de origen humano, de mono cynomolgus y de rata se expresan como proteínas de fusión Fc con un marcador flan e His (marcador Flis) en el C-terminal de la Fc (SEC ID N° de 72-74). Estas proteínas de fusión de DEC de c-Met – Fc se expresaron por separado transitoriamente en células HEK293 EBNA y se purificaron como se describe en el Ejemplo 1.

Se usa un instrumento Biacore® 2000 se utiliza para medir la cinética de unión de los anticuerpos de c-Met frente a los DEC de c-met de origen humano, de mono cynomolgus y de rata. Las mediciones se realizaron a 25 °C. Las muestras se disuelven en tampón HBS-EP (cloruro de sodio 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005 % (p / v) tensioactivo P-20, y N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 10 mM a pH 7,4; # BR-1001 -1088). El fragmento F(ab')₂ de anticuerpo de cabra anti humana de tipo IgG, fragmento F(ab')₂ específico (Jackson ImmunoResearch Inc, n° 109-006-097) se inmoviliza en celdas de flujo 1 a 4 de un chip sensor CM5 a un nivel de 4.000 unidades de respuesta (UR) usando química de acoplamiento de aminas para capturar los anticuerpos anti-c-Met.

La unión se evalúa usando múltiples ciclos. Cada ciclo se realiza a un caudal de 50 µl / min y consta de las siguientes etapas: inyección de aproximadamente 10 µl de un anticuerpo de c-Met a 10 µg / ml dirigido a una captura de de 40-100 UR, inyección de 250 µl del DEC de c-Met-Flis-Fc humano, de mono cynomolgus, o de rata (a partir de 100 nM y utilizando diluciones en serie por dos para cada ciclo), seguido de 20 minutos, para la disociación y la regeneración usando aproximadamente 30 µl de clorhidrato de glicina 10 mM, pH 1,5. Las velocidades de asociación y disociación para cada ciclo se evalúan utilizando un modelo "de unión 1: 1 (Langmuir)" en el software BIAevaluation versión 4.1. Para la unión del anticuerpo D11-S17Y al DEC de c-Met-Flis-Fc se usa un modelo de ligando heterogéneo para ajustar los datos de manera adecuada; por lo tanto, se obtienen dos afinidades de unión.

Los resultados se muestran en las Tablas 3 -5 que se exponen a continuación.

Tabla 3

Cinética de unión y afinidad de los anticuerpos de c-Met al DEC de c-Met humano-Flis-Fc			
Anticuerpo	k_{on} (1/Ms)	k_{off}(1/s)	K_D (nM)
D11-8B8	1,0 ± 0,1 x 10 ⁵	0,5 ± 0,2 x 10 ⁻⁴	0,5 ± 0,2
D11-C27G3	6,4 ± 0,2 x 10 ⁴	0,9 ± 0,2 x 10 ⁻⁴	1,4 ± 0,3
D11-S17Y	0,7 ± 0,1 x 10 ⁵	2,8 ± 0,1 x 10 ⁻⁴	4,2 ± 0,9
C8-H241	1,1 ± 0,3 x 10 ⁵	< 10 ⁻⁵	<0,1
C8-6	1,6 ± 0,4 x 10 ⁵	3 ± 2 x 10 ⁻⁴	4 ± 1
C8-co16	1,1 ± 0,2 x 10 ⁵	0,3 ± 0,2 x 10 ⁻⁴	0,3 ± 0,1

Tabla 4

Cinética de unión y afinidad de los anticuerpos de c-Met al DEC de c-Met de monos cynomolguss-Flis-Fc			
Anticuerpo	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
D11-8B8	0,78 ± 0,02 x 10 ⁵	2,23 ± 0,07 x 10 ⁻⁴	2,9 ± 0,2
D11-C27G3	0,5 ± 0,1 x 10 ⁵	3,2 ± 0,4 x 10 ⁻⁴	6,5 ± 0,7
D11-517Y	0,70 ± 0,08 x 10 ⁵	3,6 ± 0,5 x 10 ⁻⁴	5,1 ± 0,2

Cinética de unión y afinidad de los anticuerpos de c-Met al DEC de c-Met de monos cynomolgus-Flis-Fc			
Anticuerpo	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
C8-H241	$0,80 \pm 0,06 \times 10^{-5}$	$<10^{-5}$	$<0,2$
C8-6	$1,4 \pm 0,5 \times 10^{-5}$	$4,5 \pm 0,2 \times 10^{-4}$	$3,6 \pm 1,1$
C8-co16	$1,03 \pm 0,02 \times 10^{-5}$	$<10^{-5}$	$<0,1$

Tabla 5

Cinética de unión y afinidad de los anticuerpos de c-Met al DEC de c-Met de rata-Flis-Fc						
Anticuerpo	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (pM)	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/s)	K_D (nM)
D11-8B8	$2,1 \pm 0,2 \times 10^{-5}$	$1,9 \pm 0,3 \times 10^{-4}$	$0,89 \pm 0,04$			
D11-C27G3	$1,3 \pm 0,1 \times 10^{-5}$	$3,4 \pm 0,5 \times 10^{-4}$	$2,7 \pm 0,2$			
D11-S17Y	$0,66 \times 10^{-5}$	189×10^{-4}	286	$2,5 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-4}$	1,2

Estos datos demuestran que los anticuerpos C8-H241, C8-6, y C8-CO16 se unen a los DEC de c-Met humanos y de monos cynomolgus con afinidad similar, pero no a los DEC de c-Met de rata. Datos adicionales (no mostrados) indican que estos anticuerpos no se unen a los DEC de c-Met de ratón hasta 100 nM de anticuerpo con 1 µg/ml el DEC revestido sobre placas de ELISA. Los anticuerpos D11-8B8, D11-C27G3 y D11-S17Y, sin embargo, se unen a los DEC de ser humano, de mono cynomolgus y de rata.

Ejemplo 3

Mapeo de epítomos

Los epítomos de los presentes anticuerpos de c-Met se mapean mediante una combinación de espectrometría de masas con intercambio de hidrógeno-deuterio (HDXMS) (Yamada et al. (2002) Rapid Commun. Mass Spectrom. 16(4):293 – 299) y marcaje con policarbonato de dietilo (DEPC) (Mendoza et al. (2008) Anal. Chem. 80(8):2895 – 2904). La reacción de intercambio de hidrógeno-deuterio del dominio Sema de c-Met humano se lleva a cabo en presencia o ausencia de anticuerpos de c-Met. Las regiones del dominio Sema que ganan menos de deuterio en presencia de un anticuerpo que, en su ausencia, se identifican como el o los epítomo(s) para el anticuerpo. DEPC puede reaccionar con grupos amino de los restos de lisina o histidina expuestos en la superficie en el dominio Sema, formando lisina o histidina-carbamato de etilo. Si estos aminoácidos se encuentran en la región del epítomo, estarán protegidos y no reaccionarán con DEPC tras la unión del anticuerpo. Esto ayuda a localizar más y / o confirmar las regiones del epítomo determinadas mediante HDXMS.

Expresión y purificación del dominio Sema de c-Met. El dominio Sema de c-Met humano se expresa con un marcador Flis en el extremo C-terminal (SEC ID N° 76) en células HEK293 EBNA y se purifica como se describe en los Ejemplos 1 y 2. Después, la proteína purificada se almacena a 4 °C en PBS a pH 7,4. Este dominio se une a los anticuerpos de c-Met de la presente invención con una afinidad similar a la del DEC de c-Met humano de longitud completa, lo que indica que los epítomos para estos anticuerpos están localizados en esta región de c-Met humano.

Desglicosilación y desialización del dominio Sema de c-Met. 100 µl de 1,2 mg/ml del dominio Sema de c-Met humano se tratan con 1 µl de solución PNGase F (Prozyme, GKE-5006B) a 37 °C durante la noche para la N-glicosilación. El análisis CL/EM demuestra que la mayor parte de la proteína está desglicosilada después de este tratamiento. Por separado, 100 µl de 1,2 mg/ml de solución de dominio Sema de c-Met humano se tratan con 2 µl de 10 U/ml de solución de neuraminidasa (Roche, n° Cat. 10 269 611 001) a 37 °C durante 1 hora para desialilar el dominio Sema.

Formación de complejos de dominio Sema de c-Met Sema Dominio / Anticuerpo. 10 µl de solución de dominio Sema de c-Met desglicosilado (1,2 mg/ml) se mezclan con una parte alícuota que contenía 29 µg de proteína de la solución de anticuerpo (2,07 µl de C8-H241, 2,01 µl de D11-8B8, o 3,87 µl de un Mab control no relacionado), y después se diluyen con una solución 1X PBS hasta un volumen final de 40 µl. Por separado, 5 µl de la solución de dominio Sema de c-Met desialilado (1,2 mg/ml) se mezclan con una parte alícuota que contenía 14 µg de proteína de la solución de anticuerpo (1,04 µl de C8-H241, 1,01 µl de D11-8B8, o 1,94 µl de un Mab control no relacionado), y después se diluyen con una solución 1X PBS hasta un volumen final de 15 µl. Cada una de las soluciones mixtas de cada anticuerpo se somete después a análisis HDXMS.

Ensayos HDXMS. 4 µl de la mezcla del dominio Sema de c-Met /anticuerpo desglucosilada o desialilada se mezclan con 16 µl de 100 % de D₂O (Acros, Código 166 310 500; 80 % de D durante el intercambio) y se incuban a temperatura ambiente durante 90 segundos. Después, el intercambio se inactiva con 50 µl de 0,5 % (v / v) de ácido fórmico en agua a 0 °C. La solución inactivada se trata inmediatamente con 2 µl de 5 mg / ml (v / v) de solución de pepsina (Sigma, Cat. N° # P6887) a 0 °C durante 3,5 o 4 minutos. La solución digerida se inyecta inmediatamente manualmente en una columna de RP-HPLC (Polymer Laboratories, Part n° 1912–1802; 2,1 x 50 mm, tamaño de poro de 1000 Å, tamaño de partícula 8 µm). La corriente de tampón para de la bomba de HPLC (Waters, 2795 HPLC) pasa a través de un tubo de metal (aproximadamente 1 ml) a un inyector manual. El eluido de la columna se pasa después a un espectrómetro de masas Micromass LCT Premier o SYNAPT. El tubo de metal, el circuito de inyección y la columna se sumergen en un baño de agua helada.

La columna se equilibra con 99 % de A (0,05 % (v / v) de TFA (ácido trifluoroacético) acuoso y 1 % de B (0,04 % (v / v) de TFA en acetonitrilo) a un caudal de 0,2 ml / min. Se realiza una elución por gradiente isocrático durante 1 minuto, de 1 al 10 % de B durante 1 minuto, a 40 % de B durante 12 minutos, a 90 % de B durante 4 minutos. con una retención de 3 minutos, y después se devolvió rápidamente a las condiciones iniciales. La espectrometría de masas se lleva a cabo en un espectrómetro de masas Micromass LCT Premier con pulverización positiva, modo W, y los ajustes siguientes: un voltaje capilar de 1,5 kV, un voltaje de cono de 100 V, abertura 1 de 25 V, un intervalo de masa de 200 a 2.000, una temperatura de desolvatación de 150 °C, y un flujo de gas de desolvatación de 500 l / h. El espectro de masas de cada péptido péptico de c-Met se obtiene después del intercambio de D / H con o sin anticuerpo de c-Met. La masa promedio de cada péptido se calcula de acuerdo a la distribución isotópica del pico del ion más intenso.

Marcaje con DEPC de los complejos c-Met / Anticuerpo. 8,3 µl de la solución del dominio Sema de c-Met humano de 1,2 mg/ml mezclan con una solución de anticuerpos (24 µg de proteína: 1,71 µl de C8–H241, 1,67 µl de D11–8B8, o 3,2 µl de Mab control sin tratar), y 1 X solución de PBS hasta un volumen final de 76 µl. Cada mezcla de c-Met/anticuerpo se trata con 4 µl de 10 mg/ml (p/v) de DEPC en isopropanol a temperatura ambiente durante 5 minutos y después se inactiva con 10 µl de 20 mg/ml de histidina en tampón Tris–HCl 0,1 M, a pH 8, y 10 µl de 0,2 mg/ml de lisina en tampón Tris–HCl 0,1 M a pH 8. Cada solución se mezcla con 5 µl de 0,2 mg / ml (p / v) solución de tripsina porcina (Promega, n° Cat. # V528A), y la mitad de la mezcla se mezcla con 0,5 µl de 50 mg / ml (p / v) de solución de ditiotretitol. Cada solución de muestra se incuban a 37 °C durante 5 horas y después se trata con 0,5 µl de solución de PNGasa F durante una hora adicional. Cada solución digerida se acidifica con 2 µl de 10 % de solución de ácido acético (v / v). 2 µl de 100 mg/ml de solución TCEP (tris (2-carboxietil) fosfina clorhidrato (Sigma, n° de Cat. # C4702–2G) se añaden al digesto no reducido compendio sin ditiotretitol añadido. Cada una de las soluciones se somete a análisis CL / EM utilizando un espectrómetro de masas Waters Acquity UPLC y Waters SYNAPT. La HPLC utiliza una columna Waters Acquity UPLC BEH C8 (2,1x50 mm, 1,7 µm, Waters, parte n° 186002877) a 60 °C, y los péptidos se eluyen con un gradiente de acetonitrilo en un sistema de fase móvil de HPLC agua / acetonitrilo/TFA. Para los digestos se usa un tiempo de carrera de 45 minutos. La columna se equilibra con 99 % de A (0,05 % (v / v) solución acuosa de TFA) y 1 % de B (0,04 % (v / v) de TFA en acetonitrilo) a un caudal de 0,2 ml / min. Se realiza una elución por gradiente en estado isocrático durante 2 minutos, de 1 al 25 % de B durante 25 minutos, a 45 % de B durante 10 minutos, a 90 % de B durante 1 minuto, con una retención de 1,5 minutos (al mismo periodo de tiempo, caudal de 0,3 ml/min) y después se devolvió rápidamente a 1 % de B.

Resultados. El Mab C8-H241 parece unirse un epítipo conformacional que comprende cuatro regiones del dominio Sema de c-Met, situado en el cadena α del dominio extracelular de c-Met humano (residuos de aminoácidos 25-307 de la SEC ID N° 75):

¹²¹VVDITYDDQL¹³⁰ (SEC ID N° 77),

¹³¹ISCGSVNRGTCQRHVFPNHNTADIQS¹⁵⁶ (SEC ID N° 78),

¹⁷⁹ALGAKVLSSVKDRFINFF¹⁹⁶ (SEC ID N° 79), y

²¹⁶VRRLKETKDGFM²²⁷ (SEC ID N° 80).

Más particularmente, el Mab C8-H241 une c-Met interactuando con uno o más residuos de aminoácidos dentro de:

¹²³DTYYDD¹²⁸ (SEC ID N° 81) inclusive,

¹⁴⁴HVFPNHNTADIQS¹⁵⁶ (SEC ID N° 82) inclusive,

¹⁹²FINF¹⁹⁵ (SEC ID N° 83) inclusive, and

²²⁰KETKDGFM²²⁷ (SEC ID N° 84) inclusive.

La unión del Mab C8-H241 a la región ¹⁴⁴HVFPNHNTADIQS¹⁵⁶ (SEC ID N° 82) lo convierte capaz de unirse al dominio extracelular de c-Met humano (SEC ID N° 75) y de mono cynomolgus (aminoácidos 25 a 932 de SEC ID N° 73) con una afinidad comparable, pero no a c-Met de rata o de ratón, hasta 100 nM de anticuerpo en los ensayos de unión.

La unión del Mab D11-8B8 a la cadena α - el dominio Sema de c-Met parece estar localizada en una región, es decir, los residuos de aminoácidos dentro de un epítipo lineal dentro de la secuencia de aminoácidos ⁸⁴YKTPGVLEHPDCFPQCDCSSKANL₁₀₇ (SEC ID N° 85) inclusive, más particularmente la región ⁹⁵CFPCQDCSSKA₁₀₅ (SEC ID N° 86) inclusive. El epítipo para Mab D11-8B8 se ve confirmado por experimentos de extracción de epítipo (Dhungana et al. (2009) Methods Mol. Biol. 524:87 – 101). El dominio Sema de c-Met se digiere con tripsina porcina (Promega) y el producto de digestión se mezcla entonces con el Mab D11-8B8 biotinilado, usando el kit EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, Prod. #1754210), para unir los péptidos c-Met. El D11-8B8 biotinilado con o sin péptidos de c-Met unidos es capturado por la resina de estreptavidina agarosa de alta capacidad (Thermo Scientific, Prod. # 20359). Los péptidos unidos se liberan por ácido fórmico al 0,15 % (v / v) en H₂O, y a continuación, se identifican mediante CL/EM.

Ejemplo 4

Unión preferencial de anticuerpos contra c-Met frente a los DEC de RON y Plexina A2

Las proteínas humanas con la mayor identidad de secuencia con c-Met son RON y Plexina A2. Este experimento compara la especificidad del anticuerpo c-Met que se une a los DEC de c-Met, RON, y Plexina A2.

Los pocillos de placas de unión alta de 96 – pocillos de EIA/RIA (Costar, #2592) se recubren con 100 μ l de 1 μ g/ml del dominio extracelular (DEC) de la fusión c-Met humano-Fc-Flis (SEC ID N° 72), DEC de RON-Fc (R&D Systems, #1947-MS), o DEC de Plexina A2-Fc (Abnova, Taipei, Taiwán #H00005362-P01) en tampón de recubrimiento (BioFX Labs, # COAT-1000-01) durante la noche a 4 °C. Los pocillos se aspiran y los sitios de unión no específica se bloquean mediante la adición de 200 μ l de tampón de bloqueo (solución salina tamponada con Tris, a pH 8,0, con 0,05 % (v/v) de polisorbato 20 (Tween-20) (TBS-T) (BioFX Labs, # WSHW-1000-01) más 1 % (p/v) de seroalbúmina de suero (BSA) (Jackson Immuno, #001-000-162) incubando durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar las placas tres veces con tampón de lavado (TBS-T), se añaden de 100 μ l/pocillo de diluciones en serie a 1:6 de anticuerpos c-Met en tampón de bloqueo (a partir de 100 μ g/ml) y se incuban a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se lavan y se incuban con 100 μ l / pocillo de F(ab)₂ de IgG anti-humana de cabra conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Labs de # 109-036-097) en tampón de bloqueo durante 90 minutos. Después de lavar las placas, se añaden 100 μ l/pocillo de solución de sustrato / pocillo (BioFX, # TMBW-1000-01) y las placas se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para detener la reacción se añaden 100 μ l/pocillo (BioFX, # LSTP-1000-01). Las señales colorimétricas se desarrollan y se leen a 450 nm usando un lector de placas SpectraMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El anticuerpo de c-Met de unión a los DEC DE c-Met, RON y Plexina A2 es proporcional a la producción de la señal de color.

Como se muestra en la Tabla 6, ambos anticuerpos de c-Met C8 y D11 de la presente invención se unen preferentemente al DEC de c-Met humano en comparación con el DEC de RON o los DEC de Plexina A2.

Tabla 6

Unión preferente de los anticuerpos de c-Met a los DEC de c-Met humano frente a los DEC de RON y Plexina A2									
	A450 nm promedio								
Dosis del anticuerpo	C8-H241			C8-6			C8-co16		
(ng/ml)	DEC de c-Met	DEC de RON	Plexina A2	DEC de c-Met	DEC de RON	Plexina A2	DEC de c-Met	DEC de RON	Plexina A2
0,000	0,300	0,098	0,092	0,322	0,110	0,109	0,335	0,106	0,104
0,002	0,317	0,088	0,082	0,326	0,106	0,099	0,369	0,100	0,094
0,010	0,317	0,081	0,090	0,335	0,097	0,095	0,374	0,096	0,078
0,060	0,484	0,104	0,099	0,551	0,087	0,096	0,446	0,089	0,082
0,357	0,902	0,091	0,097	0,813	0,080	0,107	0,907	0,083	0,095
2,143	2,861	0,101	0,103	2,415	0,098	0,106	2,888	0,114	0,092
12,860	4,000	0,079	0,083	4,000	0,087	0,085	4,000	0,102	0,069
77,160	4,000	0,085	0,079	4,000	0,090	0,078	4,000	0,084	0,096
462,963	4,000	0,090	0,104	4,000	0,088	0,086	4,000	0,103	0,092

ES 2 549 760 T3

2777,778	4,000	0,085	0,092	4,000	0,088	0,094	4,000	0,095	0,114
16666,667	4,000	0,117	0,125	4,000	0,124	0,118	4,000	0,198	0,284
100000,000	4,000	0,267	0,310	4,000	0,170	0,171	4,000	0,421	0,983
Error estándar									
0,000	0,006	0,015	0,007	0,011	0,000	0,004	0,003	0,005	0,011
0,002	0,003	0,006	0,002	0,012	0,005	0,006	0,023	0,000	0,006
0,010	0,002	0,000	0,005	0,001	0,004	0,009	0,015	0,012	0,002
0,060	0,055	0,001	0,002	0,144	0,004	0,005	0,029	0,003	0,002
0,357	0,004	0,004	0,002	0,022	0,005	0,003	0,005	0,007	0,000
2,143	0,032	0,004	0,005	0,041	0,004	0,003	0,128	0,002	0,007
12,860	0,000	0,001	0,012	0,000	0,000	0,007	0,000	0,004	0,004
77,160	0,000	0,002	0,014	0,000	0,008	0,007	0,000	0,003	0,001
462,963	0,000	0,004	0,003	0,000	0,006	0,001	0,000	0,013	0,001
2777,778	0,000	0,004	0,002	0,000	0,004	0,001	0,000	0,007	0,000
16666,667	0,000	0,005	0,004	0,000	0,004	0,003	0,000	0,003	0,002
100000,000	0,000	0,008	0,012	0,000	0,002	0,003	0,000	0,011	0,093

D11-8B8			D11-C27G3			D11-S17Y		
DEC de c-Met	DEC de RON	Plexina A2	DEC de c-Met	DEC de RON	Plexina A2	DEC de c-Met	DEC de RON	Plexina A2
0,297	0,097	0,081	0,2844	0,0791	0,0771	0,31475	0,1129	0,10795
0,299	0,082	0,078	0,2708	0,07065	0,07965	0,3091	0,09705	0,09345
0,304	0,074	0,078	0,2904	0,0715	0,0763	0,31405	0,0868	0,0986
0,445	0,094	0,073	0,45965	0,0695	0,06605	0,37355	0,0857	0,09455
1,314	0,073	0,074	1,43965	0,07085	0,0792	0,78915	0,08475	0,0924
2,416	0,069	0,073	2,5266	0,0655	0,0742	2,1432	0,1085	0,08235
3,931	0,079	0,075	4	0,07835	0,0641	4	0,0825	0,0768
4,000	0,079	0,066	4	0,06725	0,076	4	0,08195	0,07575
4,000	0,071	0,077	4	0,0981	0,1045	4	0,08185	0,0783
4,000	0,088	0,093	4	0,20445	0,30325	4	0,09255	0,0955
4,000	0,165	0,181	4	0,67565	1,33475	4	0,1274	0,1491
4,000	0,544	0,498	3,9211	2,30295	3,37085	4	0,23775	0,3146
Error estándar								
0,006	0,003	0,003	0,0087	0,0017	0,0106	0,00515	0,0012	0,00035

D11-8B8			D11-C27G3			D11-S17Y		
DEC de c-Met	DEC de RON	Plexina A2	DEC de c-Met	DEC de RON	Plexina A2	DEC de c-Met	DEC de RON	Plexina A2
0,011	0,002	0,002	0,0194	0,00595	0,00185	0,0228	0,00065	0,01725
0,012	0,002	0,001	0,0051	0,0018	0,0017	0,01195	0,0058	0,0079
0,007	0,017	0,003	0,01495	0,0006	0,00335	0,00375	0,0013	0,00035
0,092	0,007	0,004	0,02935	0,00695	0,0017	0,04195	0,00075	0,0039
0,044	0,002	0,001	0,2742	0,0002	0,0015	0,0841	0,0054	0,00015
0,069	0,005	0,002	0	0,01505	0,0043	0	0,0029	0,0061
0,000	0,007	0,000	0	0,00275	0,0066	0	0,00445	0,00455
0,000	0,005	0,004	0	0,0063	0,0032	0	0,00485	0,0089
0,000	0,003	0,005	0	0,00975	0,00535	0	0,00705	0,0055
0,000	0,007	0,004	0	0,03125	0,03495	0	0,0007	0,0035
0,000	0,016	0,006	0,0789	0,07335	0,14345	0	0,00865	0,004

Ejemplo 5

Los anticuerpos de c-Met bloquean la unión de HGF/c-Met

5 Los ensayos de unión in vitro se utilizan para determinar la inhibición de la unión de HGF a c-Met por los presentes anticuerpos de c-Met.

Los pocillos de placas de unión alta de 96 pocillos de EIA/RIA (Costar, #2592) se revisten con 100 µl del DEC de c-Met humano-Fc-Flis (SEC ID N° 72) (2 µg/ml) en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco 's (DPBS) durante la noche a temperatura ambiente; se lavan cuatro veces con tampón de lavado (solución salina tamponada -Tris, pH 8,0, con 0,05 % (v/v) de polisorbato 20 (TWEEN®-20) (TBS-T) (BioFX Labs, # WSHW-1000-01) en un lavador de placas; se bloquean mediante la adición de 300 µl de tampón de bloqueo (TBS-T más 1 % (p/v) de seroalbúmina bovina (BSA) (Jackson Immuno, #001-000-162); y se incuban durante 60 minutos a 37 °C. A continuación se elimina el tampón de bloqueo de los pocillos y se añaden 50 µl de anticuerpos en tampón de bloqueo a concentraciones finales tal como se indican en la Tabla 7 a cada pocillo, respectivamente. Se añade tampón de bloqueo a los pocillos de control con solo HGF. Las placas con anticuerpos de c-Met se incuban durante 90 minutos a 37 °C. Se añaden 50 µl de factor de crecimiento de hepatocitos humanos (HGF) (R & D Systems, # 294) en tampón de bloqueo a una concentración final de 10 ng / ml a cada pocillo, excepto los pocillos con solo el anticuerpo control. Las placas que contienen la mezcla anticuerpo de c-Met/ HGF se incuban en un agitador de placas durante dos horas a temperatura ambiente. Después, los pocillos se lavan cuatro veces con TBS-T en un lavador de placas. A continuación a cada pocillo se añaden 100 µl de anticuerpo anti-HGF biotinilado (R&D Systems, # BAF294) en tampón de bloqueo a una concentración final de 100 ng / ml. Las placas se incuban durante 90 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan de nuevo cuatro veces con TBS-T en un lavador de placas. A cada pocillo se añaden 100 µl de una dilución a 1:200 de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) (R & D Systems, DY998) en tampón de bloqueo. Las placas se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan cuatro veces con TBS-T en un lavador de placas. A continuación se añaden 100 µl/pocillo de la solución de sustrato (BioFx, #TMBW-1000-01) y las placas se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para detener la reacción se añaden 100 µl/pocillo de solución de parada (BioFx, # LSTP-1000-01). Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 450 - 570 nm en un lector de microplacas (Spectra, MAX 190) y no se resta fondo.

Como se muestra en la Tabla 7, los anticuerpos de c-Met C8 y D11 de la presente invención bloquean la unión HGF humano/ c-Met.

Tabla 7

inhibición de a unión de HGF humano a c-Met humano mediante los anticuerpos C8 y D11								
A450 nm PROM.								
Dosis del anticuerpo (ng/ml)	hlgG2	D11-8B8	D11-27G3	D11-S17Y	hlgG4	C8-6	C8-H241	C8-co16
0,00	2,43	2,43	2,43	2,43	2,61	2,61	2,61	2,61
0,48	2,46	2,51	2,37	2,15	2,41	2,56	2,45	2,05
1,91	2,87	2,48	2,31	1,98	2,49	2,59	2,46	2,18
7,63	2,70	2,41	2,27	2,08	2,88	2,64	2,53	2,20
30,52	2,41	2,32	2,38	2,07	2,63	2,42	2,42	2,08
122,07	2,52	1,92	1,60	1,69	2,44	2,00	1,77	1,30
488,28	2,53	1,30	0,94	1,29	2,44	1,33	0,73	0,70
1953,13	2,43	1,43	0,97	1,23	2,27	1,08	0,68	0,60
7812,50	2,50	1,24	0,91	1,12	2,49	0,95	0,70	0,57
31250,00	2,50	1,31	0,94	1,17	2,67	0,98	0,77	0,56
125000,00	2,43	1,38	0,89	1,35	3,00	1,32	0,69	0,38
Error est.								
0,00	0,06	0,06	0,06	0,06	0,10	0,10	0,10	0,10
0,48	0,02	0,13	0,01	0,09	0,24	0,02	0,14	0,15
1,91	0,27	0,08	0,08	0,03	0,00	0,03	0,16	0,12
7,63	0,14	0,01	0,21	0,08	0,14	0,03	0,06	0,09
30,52	0,09	0,02	0,31	0,09	0,16	0,01	0,03	0,01
122,07	0,09	0,07	0,03	0,02	0,08	0,10	0,02	0,03
488,28	0,00	0,04	0,04	0,02	0,01	0,02	0,00	0,01
1953,13	0,13	0,16	0,02	0,05	0,00	0,01	0,01	0,01
7812,50	0,04	0,01	0,01	0,02	0,25	0,07	0,01	0,02
31250,00	0,06	0,02	0,02	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03
125000,00	0,07	0,03	0,01	0,08	0,13	0,47	0,01	0,00
Abreviaturas: PROM= promedio; Err. est.= error estándar								

Ejemplo 6

5 Los anticuerpos de c-Met inducen una débil fosforilación de c-Met en comparación con el factor de crecimiento de hepatocitos y el Mab 5D5 agonista

Tras la estimulación con HGF, la línea celular de carcinoma de pulmón A549 exhibe incremento de la fosforilación de c-Met en el residuo de tirosina 1349. Se usa un ensayo ELISA de c-Met fosforilado (p-Met) para medir la actividad agonista de diversos anticuerpos DE c-Met en ausencia de HGF, así como de Mab 5D5 y el propio HGF.

10 Células A549 (ATCC, # CCL-185) se cultivan en medio de Ham F12K + glutamina 2 mM (Invitrogen, # 21127-022) + 10 % de FBS (Invitrogen, #10082). Las células se siembran a 6×10^4 células / pocillo en el medio completo de suero

como anteriormente en placas de 96 pocillos y se incuban durante la noche a 37 °C en 5 % (v / v) de CO₂. Se retira el medio de los pocillos y las células se dejan sin alimentos en 100 µl de medio de Ham F12K + glutamina 2 mM + 0,5 % de FBS durante seis horas a 37 °C en 5 % (v / v) CO₂. Los anticuerpos o HGF are se diluyen en el medio de cultivo sin nutrientes, añadido a concentraciones finales tal como se indica en la Tabla 8, y se incuban durante 15 minutos a 37 °C. El medio se aspira y las células se lisan en 50 µl de tampón de lisis (Tris 10 mM (Invitrogen, #15567-027), NaCl, 150 mM, ácido etilendiaminotetraacético 2 mM (EDTA) (Invitrogen, #15575-038), NaF 50 mM (Sigma, #S1504), 1 % (v/v) de octilfenoxi polietoxi etanol (TRITON®-X 100; Sigma, #T8787), ortovanadato de sodio 2 mM (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, #567540), inhibidor de la proteasa (Sigma, St. Louis, MO; #P8340), cóctel de inhibidores de fosfatasa 1 (Sigma #P2850), y cóctel 2 de inhibidor de fosfatasa (Sigma #P5726)) por pocillo y se incuban en hielo durante 15-20 minutos. Los lisados celulares se utilizan en el ensayo ELISA descrito a continuación para determinar la fosforilación de c-Met en el residuo Y1349.

El anticuerpo de captura de c-Met se diluye en tampón de revestimiento Bup H (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, # 28382) a 2 µg / ml, añadido a placas de ELISA (Greiner Bio-One, Monroe, NC, # 655081) y se incuban durante la noche a 4 °C. Los pocillos se aspiran, se lavan tres veces con TBS-T (BioFX, Owings Mills, MD, WSH-1000/01), y luego se bloquean con 200 µl de tampón de bloqueo (TBS-T más 2 % (p / v) de BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan tres veces con TBS-T. A continuación, se añaden 25 µl de lisados celulares más 75 µl de tampón de bloqueo, y las placas se incuban durante la noche a 4 °C. Las placas se lavan a continuación tres veces con TBS-T. Se añaden 100 µl de 0,5 mg / ml del anticuerpo policlonal de pY1349 c-Met (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, # 3133) en tampón de bloqueo a cada pocillo, y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavan tres veces con TBS-T. Después se añaden a cada pocillo 100 µl del anticuerpo policlonal IgG anti-conejo de cabra conjugada con peroxidasa diluida a 1/10.000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, # 111-035-144) en tampón de bloqueo y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan a continuación tres veces con TBS-T. Se añaden 100 µl de solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (BioFX, # TMBW-1000/01) a cada pocillo, seguido por la adición de 100 µl de solución de parada (BioFX, # LSTP-1000/01). Las placas se leen a 450 nm usando un lector de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) y los valores de la muestra se determinan usando el software SOFTmax Pro 3.1.2 (Molecular Devices).

Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Efecto de los anticuerpos de c-Met, HGF y el Mab agonista 5D5 sobre la fosforilación de c-Met en células A549

Conc. del anticuerpo (µg / ml)	Señal de p-Met C8-H241	Señal de p-Met C8-6	Señal de p-Met hlgG4
30	0,333	0,272	0,061
10	0,418	0,334	0,077
3,333	0,450	0,328	0,068
1,113	0,465	0,365	0,087
0,370	0,340	0,211	0,082
0,123	0,304	0,127	0,067
0,041	0,130	0,125	0,268
0,014	0,078	0,105	0,074
0,005	0,074	0,070	0,074
0,002	0,070	0,081	0,117

Conc. de HGF (ng/ml)	Señal de p-Met	Conc. del anticuerpo (ng /ml)	Señal de p-Met Mab 5D5
300	10,615	5	3,290
100	6,129		
33,33333	2,267		
11,11111	1,0667		
3,703704	0,461		
1,234568	0,211		
0,411523	0,142		
0,137174	0,128		
0,045725	0,100		
0,015242	0,148		

Los datos demuestran que el HGF y el Mab 5D5 agonista de c-Met estimulan fuertemente la fosforilación de c-Met, mientras que los Mab de c-Met actuales, C8-H241 y C8-6, estimulan débilmente la fosforilación de c-Met. Se obtienen resultados similares en las líneas celulares HCT116, H460, y MDA-MB-231.

- 5 El Mab D11-8B8 produce resultados similares.

Ejemplo 7

Los anticuerpos de c-Met inhiben la fosforilación de c-Met inducida por HGF

- 10 La unión de HGF a C-Met tiene como resultado la fosforilación en tirosina de moléculas de c-Met y la activación de la vía de señalización de c-Met. En este ejemplo, la línea celular de cáncer de colon humano HCT116, que es sensible a HGF, se utiliza para evaluar la inhibición de la fosforilación inducida por HGF en los residuos de tirosina 1230, 1234 y 1235 de c-Met por los presentes anticuerpos de c-Met.

- 15 Células HCT116 (ATCC, Manassas, VA, # CCL-247) se resuspenden hasta 150.000 células / ml en medio de McCoy 5A (Invitrogen, Carlsbad, CA, # 16600-082) más penicilina / estreptomycin (Invitrogen, # 15140-122) con 10 % (v / v) de suero bovino fetal (FBS) (Invitrogen, # 10082-147). 0,2 ml de las células HCT116 resuspendidas se añaden a placas de microtitulación de 96 pocillos (Corning, Lowell, MA, #3596) a 30.000 células / pocillo, y las células se incuban a continuación durante 48 horas a 37 ° C en 5 % (v/v) de CO₂. Después, se aspira el medio de cultivo es y no se alimenta a las células en 100 µl de medio de McCoy 5A además de penicilina / estreptomycin con 0,1% (p / v) de BSA durante 24 horas a 37 ° C en 5 % (v / v) de CO₂. Se añaden 25 µl de azida sódica (concentración final de 0,01 % (p / v)) (Sigma, # S2002), seguido inmediatamente de la adición de 25 µl de diluciones x8 de anticuerpos de
- 20 c-Met a medio de McCoy 5A, más penicilina / estreptomycin con 0,1 % (p / v) de BSA, y las células se incuban durante 30 minutos a 37 ° C en 5 % (v / v) de CO₂. A cada pocillo se añaden 50 µl de HGF a una concentración final de 200 ng/ml y las células se incuban durante 15 minutos adicionales a 37 ° C en 5 % (v / v) de CO₂. DESPUÉS SE ASPIRA EL MEDIO y se añaden 50 µl de tampón de lisis celular (Tris 10 mM (Invitrogen, #15567-027), NaCl 150 mM, ácido 2 mM etilendiaminotetraacético (EDTA) 2 mM (Invitrogen, #15575-038), NaF 50 mM (Sigma, #S1504), 1 % (v/v) de octilfenoxi polietoxi etanol (TRITON®-X100; Sigma, #T8787), ortovanadato de sodio 2 mM (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, #567540), e inhibidor completo de la proteasa, EDTA libre (Roche, Basel, Switzerland, #11836170001). Las células se incuban en el tampón de lisis a temperatura ambiente durante 15-30 minutos. Los lisados celulares se analizan para detectar la fosforilación en tirosina de c-Met mediante ELISA del siguiente modo.

- 30 El anticuerpo de captura de c-Met se diluye en tampón de recubrimiento (BioFX, Glendora, CA, CAPA-1000/01) a 2 µg/ml. Se añaden 110 µl de anticuerpo diluido por pocillo a placas de ELISA Greiner Bio-One, Monroe, NC, #655081), y las placas se incuban durante la noche a 4 °C. Los pocillos se aspiran, se lavan dos veces con TBS-T, y después se bloquean con 200 µl de tampón de bloqueo (TBS-T más 2 % (p / v) de BSA) durante 1 hora. Las placas se lavan dos veces con TBS-T. A continuación, se añaden 25 µl de lisados celulares más 75 µl de tampón de
- 35 bloqueo o 100 µl de diluciones de lisados de células MKN45 (diluidas con tampón de bloqueo, como patrón), y las placas se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavan a continuación cuatro veces con TBS-T. Después, a cada pocillo se añaden 100 µl de 0,5 µg/ml de anticuerpo policlonal pYpYpY1230/1234/1235 c-

- Met (Invitrogen, #44–888G) en tampón de bloqueo y las placas se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavan cuatro veces con TBS-T. Después se añaden 100 µl de anticuerpo policlonal IgG de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, #111–035–144) en tampón de bloqueo y la mezcla se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan a continuación seis veces con TBS-T. Se añaden 100 µl de solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (BioFX, # TMBW-1000/01) a cada pocillo, seguido por la adición de 100 µl de solución de parada (BioFX, # LSTP-1000/01). Las placas se leen a 450 nm con una corrección 570 nm usando un lector de placas SpectraMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La curva estándar se establece mediante el análisis de 4 parámetros y los valores de la muestra se determinan utilizando el software 3. 1. 2 Pro SOFTmax (Molecular Devices).
- 5
- 10 El porcentaje de inhibición de fosforilación de la tirosina de c-Met se establece a un promedio de tratamiento con HGF sin adición de anticuerpos de c-Met (inhibición del 0 %), y la inhibición del 100 % se establece en el promedio de tratamiento con azida sódica (sin tratamiento con HGF o con anticuerpos de c-Met).
- La Tabla 9 muestra el promedio de los tratamientos por triplicado por experimento para tres experimentos con errores estándar. Los datos demuestran que cinco de seis anticuerpos de c-Met de la presente invención inhiben significativamente la fosforilación de la tirosina de c-Met inducida por HGF en comparación con la de los controles de isotipo IgG2 e IgG4 humanos.
- 15

Tabla 9

Porcentaje de inhibición de la fosforilación en tirosina de c-Met inducida por HGF por los anticuerpos C8 y D11															
Tratamiento con el anticuerpo		Dosis del anticuerpo:													
		10 µg/ml		2 µg/ml		0,4 µg/ml		0,08 µg/ml		0,016 µg/ml		0,0032 µg/ml			
		promedio	Err. est.	promedio	Err. est.	promedio	Err. est.	promedio	Err. est.	promedio	Err. est.	promedio	Err. est.		
D11-8B8	IgG2	19,56	4,68	40,74	8,24	35,04	6,43	10,52	7,41	-6,68	9,48	-10,37	6,79		
D11-C27G3	IgG2	1,25	7,55	31,78	7,71	38,10	4,97	20,79	5,72	5,73	8,95	9,72	7,09		
D11-S17Y	IgG2	16,73	8,72	31,39	6,43	15,91	6,05	-3,24	10,54	2,53	8,52	9,48	8,51		
C8-H241	IgG4	60,08	5,27	62,20	2,10	59,09	3,05	22,09	4,92	14,68	12,40	-12,33	10,18		
C8-co-16	IgG4	65,40	3,94	58,96	3,37	45,08	3,44	9,77	9,14	-2,89	10,95	-10,72	5,41		
C8-6	IgG4	14,88	10,78	27,94	3,80	16,83	4,36	7,79	7,68	-6,06	8,84	-11,34	8,65		
5D5	mIgG1	64,12	3,31	63,75	4,44	42,55	4,27	11,87	7,73	-3,50	9,70	-6,07	5,68		
hIgG2	Control del isotipo	6,24	5,31	17,53	5,74	9,31	6,56	-1,58	8,16	9,49	6,77	-10,21	6,78		
hIgG4	Control del isotipo	-1,47	5,76	-6,62	9,07	-16,07	7,01	-21,70	9,09	-7,96	10,97	-14,40	7,37		
mIgG1	Control del isotipo	5,46	6,31	9,76	9,27	13,43	8,18	-10,59	10,31	-5,42	10,53	-9,76	8,42		
Sin tratar		Prom.		Err. est.											
		100,00		0,98											
		0,001		2,76											
HGF		200 ng/ml		% de inhibición de fosfo-Met estimulado por HGF medido mediante ELISA											

Ejemplo 8**Inducción de internalización de c-Met por los anticuerpos de c-Met**

- Los experimentos descritos en este ejemplo usan análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) para demostrar que los presentes anticuerpos de c-Met se unen a las moléculas de c-Met de la superficie celular e inducen internalización de c-Met. Las células MKN45 empleadas constitutivamente expresan niveles altos de c-Met total y exhiben fosforilación de c-Met independiente de HGF como resultado de la amplificación del gen *MET*. La internalización de c-Met parece inducir la degradación de c-Met (véanse los Ejemplos 10 y 19), lo que tiene como resultado la inhibición de la vía de señalización de c-Met.
- Los pocillos de placas de cultivo tisular de 6 pocillos (Costar, # 3598) se siembran con $1,5 \times 10^5$ células tumor gástrica humanas MKN45 (Japan Health Sciences Foundation, Health Science Research Resource Bank, #JCRB0254) en 2 ml de medio de cultivo (RPMI-1640 (Invitrogen, # 11835), el 10 % (v / v) de FBS (Invitrogen, # 10082); L-glutamina 2 mM (Invitrogen, # 25030); 100 U / 500 ml de penicilina G, y 100 µg / 500 ml de estreptomicina (Invitrogen, # 15140)). Las placas se incuban durante 24 horas a 37 °C con 95% de humedad relativa y 5 % (v / v) de CO₂. Después, los anticuerpos se añaden a los pocillos a una concentración final de 5 µg / ml. Después del tratamiento durante la noche, se retira el medio de cultivo de los pocillos y se reemplaza con 1 ml de solución de disociación celular libre de enzimas (Chemicon, # S-014-B). Las células se recogen en tubos de centrifuga después de haber sido incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se lavan una vez en medio de cultivo seguido de un lavado más en tampón de unión (DPBS con 1 % (p / v) de BSA y 0,01 % (p / v) de azida sódica). Antes de células de la tinción, un anticuerpo de c-Met, que reconoce un epítipo diferente de los presentes anticuerpos de c-Met se marca mediante el uso de un kit de marcaje Alexa Fluor 488 Monoclonal Antibody Labeling Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, # A-20181) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. A las células se añaden 100 µl de tampón de unión que contiene 2 µg / ml del anticuerpo marcado con Alexa Fluor 488, y después se incuban durante 60 minutos en hielo. Después, las células se lavan una vez con tampón de unión y se resuspenden en DPBS que contenía 2 µg / ml de yoduro de propidio (para teñir las células muertas). La cantidad de moléculas de c-Met restantes en la superficie celular se analiza mediante análisis FACS, y se adquieren 10. 000 acontecimientos para cada muestra.
- La intensidad media de la fluorescencia sobre la superficie celular refleja la cantidad de moléculas de c-Met que permanecen en la superficie de las células después del tratamiento con los anticuerpos de c-Met.
- Los datos de un experimento representativo se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

Efecto de los anticuerpos C8- and D11 sobre la Internalización de c-Met determinada por análisis FACS										
Fluorescencia media										
Anticuerpo (µg/ml)	hlgG2	D11-8B8	D11-C27G3	D11-S17Y	hlgG4	C8-6	C8-H241	C8-co16	mIgG	5D5
5,00	130,25	44,66	51,09	56,35	135,03	67,88	57,63	56,16	136,47	92,87

Los datos demuestran que la intensidad media de fluorescencia sobre la superficie de las células tratadas con los presentes anticuerpos de c-Met es menor que en las células tratadas con un correspondiente anticuerpo control de isotipo IgG o anticuerpo mIgG, lo que indica que los presentes anticuerpos inducen internalización de c-Met. Además, la intensidad media de fluorescencia sobre la superficie de las células tratadas con los presentes anticuerpos de c-Met es más baja que en células tratadas con el anticuerpo control agonista de c-Met 5D5. El % de Internalización puede calcularse del siguiente modo

$$\% \text{ Internalización} = [1 - (\text{fluorescencia media del anticuerpo de ensayo dividida por fluorescencia media del anticuerpo isótopo control})] \text{ multiplicado por } 100$$

Los datos de internalización sugieren que los presentes anticuerpos inducen dimerización de c-Met humano. Los datos de los Ejemplos 9 y 19 demuestran que los anticuerpos C8 y D11 también inducen degradación, y reducen la fosforilación de c-Met.

Los resultados de internalización complementarios se obtienen mediante microscopia confocal usando el anticuerpo C8 murino marcado con fluorescencia en células MKN45 y Caki-1.

Utilizando los anticuerpos C8-H241, C8-6, C8-co-16 y D11 murino se obtienen resultados de internalización similares en las células NIH3T3 de mono cynomolgus transfectadas con ácido nucleico que codifica el c-Met de mono cynomolgus.

Los anticuerpos C8-H241, C8-6, C8-co-16, y optD11 también inducen la internalización de c-Met en células NIH3T3 transfectadas con ácido nucleico que codifica la mutación M1149T en el dominio cinasa de c-Met humano. Los anticuerpos C8-H241, C8-6, C8-co-16 y D11 murino también inducen internalización de c-Met en células de cáncer de pulmón no microcítico H 1437 que contienen c-la mutación R988C en el dominio yuxtamembranal de c-Met. . Ambas mutaciones causan ganancia de activación constitutiva de la función de c-Met.

Ejemplo 9

Inhibición por el anticuerpo de la proliferación de células tumorales independiente de ligando *in vitro*

En este ensayo se analiza la inhibición del crecimiento de las células tumorales *in vitro* por los anticuerpos de c-Met en células MKN45 independiente de HGF en ausencia del ligando de HGF.

Los anticuerpos de c-Met y de control del isotipo se diluyen con medio de cultivo (RPMI-1640 (Invitrogen, # 11835), 10 % (v / v) de FBS, L-glutamina 2 mM (Invitrogen, # 25030), 100 U / 500 ml de penicilina G y 100 µg / 500 ml de estreptomicina (Invitrogen, # 15140)) para lograr 2X las concentraciones finales indicadas en la Tabla 11, y se añaden 50 µl de las soluciones de anticuerpos 2X a cada pocillo de placas de cultivo tisular de 96 pocillos (PerkinElmer # 1. 450 -517). Las células MKN45 (Japan Health Sciences Foundation, Health Science Research Resource Bank, #JCRB0254) se mantienen en el medio indicado anteriormente, y se vuelven a suspender a 1×10^5 células / ml en el mismo medio. 50 µl de esta resuspensión de MKN45 se añaden a cada pocillo para lograr 5×10^3 células / pocillo. Las placas se incuban durante 48 horas a 37 °C con 95 % de humedad relativa y 5 % (v / v) de CO₂. Durante las últimas seis horas del cultivo, las células se pulsan con ³H-timidina (MP Biomedicals, Solon, OH # 24066) a 1 µCi / pocillo a 37 °C, humedad relativa del 95 %, 5 % (v / v) de CO₂. Después se retira el medio y las células se lavan una vez con DPBS. Después de esto, a cada pocillo se añaden 200 µl de Optiphase Supermix (PerkinElmer, # 1200-439). Las placas se sellan y se incuban durante al menos una hora a temperatura ambiente. La ³H-timidina incorporada en las células se cuenta durante un minuto usando un contador de centelleo.

Los datos de un experimento representativo se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11
Inhibición de la incorporación de ³H–timidina en células MKN45 mediante varios anticuerpos C8 y D11

CPM PROM.											
Dosis del anticuerpo											
(mg/ml)	hlgG2	D11–8B8	D11–27G3	D11–S17Y	hlgG4	C8–co16	C8–H241	C8–6	mlgG	5D5	
20000,0	45054	11239	18407	19752	50628	11738	11425	16387	52448	35086	
3333,3	49384	11441	16920	21239	54026	12956	12063	18216	53670	38195	
555,6	51720	11925	15987	20936	54204	13476	13217	18334	54655	39496	
92,6	47562	11094	14550	21911	54264	12419	11962	23041	52241	39607	
15,4	50488	24402	28685	39695	53806	22528	23150	44771	51329	49766	
2,6	48491	44741	47034	49868	54765	53465	48761	54598	55463	54967	
0,4	46468	43334	43998	45304	55330	47485	46645	53389	51549	49563	
0,1	44822	41578	41515	44566	53856	45725	44418	51668	47709	51883	
0,0	50427	50427	44213	44213	48708	51478	51478	48708	50300	50300	
Err. est.											
20000,0	2927	114	1265	1206	2491	262	654	282	1845	764	
3333,3	2462	732	641	689	1421	388	386	314	1310	1491	
555,6	2166	605	578	267	4364	281	341	1116	1192	534	
92,6	1835	22	150	564	1733	352	636	475	1036	370	
15,4	2144	2024	941	463	1376	207	1771	422	1281	968	
2,6	2587	1914	1133	1910	1978	2164	1945	444	919	2577	
0,4	2041	650	1177	2551	1501	378	2392	162	438	1943	
0,1	1628	1734	1817	2402	678	1340	2442	1589	2092	3143	
0,0	1203	1203	841	841	1377	886	886	1377	777	777	
Abreviaturas: PROM.= promedio; CPM = cuentas por minuto; Err. est. = error estándar											

Estos datos demuestran que diversos anticuerpos de c-Met C8 y D11, de la presente invención inhiben la proliferación de células MKN45 independiente de HGF como se pone de manifiesto mediante una reducción en la incorporación de ³H-timidina. Se obtienen resultados similares en las células tumorales SNU5 y NUGC-4, cada una de las cuales exhibe sobreexpresión constitutiva y fosforilación de c-Met.

Ejemplo 10

Reducción de c-Met fosforilado y total y falta de desprendimiento del dominio extracelular de c-Met, en respuesta a los anticuerpos de c-Met

En este ejemplo se investiga si el tratamiento de las células MKN45 con anticuerpos de c-Met de la presente invención tiene como resultado la reducción de c-Met fosforilado (p-Met) y de c-Met total. Además, este ensayo se usa para determinar si el tratamiento con los anticuerpos c-Met induce el desprendimiento del DEC de c-Met en un medio acondicionado para MKN45.

Los anticuerpos de c-Met y de control del isotipo se diluyen con medio de cultivo (RPMI-1640 (Invitrogen, # 11835), 10 % (v / v) de FBS (Invitrogen, #10082), L-glutamina 2 mM (Invitrogen, # 25030), 100 U / 500 ml de penicilina G y 100 µg / 500 ml de estreptomycin (Invitrogen, # 15140)) para lograr 2X las concentraciones finales indicadas en la Tabla 12, y se añaden 50 µl de las soluciones de anticuerpos 2X a cada pocillo de placas de cultivo tisular de 96 pocillos (Costar, #3596). Las células MKN45 (Japan Health Sciences Foundation, Health Science Research Resource Bank, #JCRB0254) se mantienen en el medio indicado anteriormente, y se vuelven a suspender a 1×10^5 células / ml en el mismo medio. 50 µl de esta resuspensión de MKN45 se añaden a cada pocillo para lograr 5×10^3 células / pocillo. Las placas se incuban a continuación durante 24 horas a 37 °C con 95 % de humedad relativa y 5 % (v / v) de CO₂, y los lisados celulares se preparan como se describe en el Ejemplo 7. Además, se recoge el medio acondicionado de cada tratamiento para la cuantificación del DEC de c-Met. Los niveles de c-Met total y de p-Met en los lisados celulares de determinan mediante ELISA, y se normalizan a la concentración de proteína del lisado (determinada por BCA, Pierce # 23225).

c-Met fosforilado

La fosforilación de c-Met en los residuos de tirosina 1230, 1234 y 1235 se determina como se describe en el Ejemplo 7.

Desprendimiento de c-Met total y del DEC de c-Met

Para los ELISA de c-Met total y del DEC de c-Met, un anticuerpo de captura de c-Met se diluye en tampón de recubrimiento (BioFX, Glendora, CA, CAPA-1000/01) hasta 2 µg/ml. Se añaden 110 µl de anticuerpo diluido por pocillo a placas de ELISA Greiner Bio-One, Monroe, NC, #655081), y las placas se incuban durante la noche a 4 °C. Los pocillos se aspiran, se lavan dos veces con TBS-T, y después se bloquean con 200 µl de tampón de bloqueo (TBS-T más 2 % (p / v) de BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan dos veces con TBS-T. A continuación se añaden lisados de células MKN45, medio condicionado para MKN45 o dominio extracelular (DEC) de c-Met (SEC ID N° 75) (como patrón) y las placas se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavan a continuación cuatro veces con TBS-T. Después, a cada pocillo se añaden 100 µl de 0,5 µg/ml de anticuerpo secundario de c-Met biotinilado (Mab 5D5) que se une a un epítipo de c-Met diferente del anticuerpo de captura diluido en tampón de bloqueo y después se añaden a cada pocillo y las placas se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavan cuatro veces con TBS-T. Después se añaden 100 µl de estreptavidina conjugada con peroxidasa (diluida a 1/12.000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, #016-030-084) en tampón de bloqueo y la mezcla se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan a continuación seis veces con TBS-T. Se añaden 100 µl de solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (BioFX, # TMBW-1000/01) a cada pocillo, seguido por la adición de 100 µl de solución de parada (BioFX, # LSTP-1000/01). Las placas se leen a 450 nm con una corrección 570 nm usando un lector de placas SpectraMax 190 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La curva estándar se establece mediante el análisis de 4 parámetros y los valores de la muestra se determinan utilizando el software 3. 1. 2 Pro SOFTmax (Molecular Devices).

Como se muestra en la Tabla 12, los datos de ELISA de p-Met y c-Met total revelan que el tratamiento con el Mab C8-H241 reduce al máximo el p-Met en un 77 % y el c-Met total en aproximadamente un 67 %. El tratamiento con D11-8B8 reduce al máximo el p-Met en aproximadamente un 75 % y el c-Met total en un 63 %.

Como se ha indicado en el Ejemplo 8, estos datos demuestran que los anticuerpos C8- y D11 inducen la degradación de c-Met y reducen la fosforilación de c-Met.

Los datos de la Tabla 12 también indican que el tratamiento con los anticuerpos de c-Met C8-H241 y D11-8B8 no inducen escisión y desprendimiento del DE de c-Met.

Tabla 12

Efecto de los anticuerpos C8 y D11 en c-Met fosforilado, c-Met total, y desprendimiento del dominio extracelular de c-Met en lisados de células MKN45 y medio acondicionado								
Porcentaje de inhibición de c-Met fosforilado en MKN45								
	C8-H241		hlgG4		D11-8B8		hlgG2	
Dosis del anticuerpo (ng/ml)	Prom.	desv. est.	Prom.	Desv. est.	Prom.	Desv. est.	Prom.	Desv. est.
10000	77,0	2,4	-2,1	10,9	74,8	3,4	14,0	7,1
1000	74,1	1,3	11,1	9,7	72,8	2,0	-4,6	10,9
100	71,7	2,5	13,4	13,3	69,1	3,7	-7,6	24,4
10	42,3	3,0	5,8	11,3	37,6	5,5	6,1	11,0
	Prom.	Desv. est.						
Sin tratar	0,0	8,0						
Porcentaje de inhibición de c-Met total en MKN45								
	C8-H241		hlgG4		D11-8B8		hgG2	
Dosis del anticuerpo (ng/ml)	Prom.	desv. est.	Prom.	Desv. est.	Prom.	Desv. est.	Prom.	Desv. est.
10000	63,1	1,6	-23,7	4,1	63,0	7,0	14,1	9,1
1000	66,7	4,3	10,4	16,0	62,7	0,6	-2,4	22,4
100	61,5	3,4	-3,7	14,4	62,9	2,5	7,3	9,1
10	32,3	4,9	-3,4	13,5	34,5	8,4	15,1	7,0
	Prom.	desv. est.						
Sin tratar	0,0	25,9						
Nivel de DEC de c-Met en MKN45 –Medio acondicionado (ng / ml)								
	C8-H241		hlgG4		D11-8B8		hlgG2	
Dosis del anticuerpo (ng/ml)	Prom.	Desv. est.	Prom.	Desv. est.	Prom.	Desv. est.	Prom.	Desv. est.
10000	5,1	0,5	7,4	0,7	6,2	0,2	7,0	0,1
1000	6,1	0,8	7,6	0,4	7,2	0,5	7,2	0,5
100	5,4	0,4	7,6	0,8	6,9	1,6	7,2	0,6
10	6,6	0,2	8,4	1,1	6,2	0,4	7,2	0,1
	Prom.	desv. est.						
Sin tratar	8,3	1,0						

Ejemplo 11**Actividad agonista de los anticuerpos en células tumorales Caki-1 en ausencia de HGF**

Las células de carcinoma renal Caki-1 proliferan en respuesta a HGF. La activación de c-Met en las células Caki-1 por los anticuerpos de c-Met en ausencia de HGF se examina en este ejemplo para evaluar la actividad agonista de los anticuerpos c-Met de la presente invención.

Los pocillos de placas de cultivo tisular de 96 pocillos se siembran con 5.000 células de carcinoma de células renales humano Caki-1 (ATCC, # HTB-46) en medio de cultivo de McCoy 5A (Invitrogen, # 16600) suplementado con 10 % (v / v) DE FBS, L-glutamina 2 mM (Invitrogen, # 25030), 100 U / 500 ml de penicilina G y 100 µg / 500 ml de estreptomicina (Invitrogen, # 15140). Después de cultivar durante 24 horas, las células se dejan sin alimentar en medio bajo en suero (0,5 % (v / v) de FBS) durante otras 24 horas. Después, las células se cultivan en presencia de anticuerpos de control anti-c-Met en medio bajo en suero a concentraciones finales como se indica en la Tabla 13 durante 24 horas a 37 °C, humedad relativa del 95 %, 5 % (v / v) de CO₂. Durante las últimas seis horas del cultivo, las células se pulsan con ³H-timidina (MP Biomedicals, Solon, OH # 24066) a 1 µCi / pocillo a 37 °C, humedad relativa del 95 %, 5 % (v / v) de CO₂. Después se retira el medio y las células se lavan una vez con DPBS. Después de esto, a cada pocillo se añaden 200 µl de Optiphase Supermix (PerkinElmer, # 1200-439). A continuación, las placas se sellan y se incuban durante al menos una hora a temperatura ambiente. La ³H-timidina incorporada en las células se cuenta durante un minuto usando un contador de centelleo.

Los datos de un experimento representativo se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13
Efecto de los anticuerpos C8 y D11 en la incorporación de ³H-timidina en células Caki-1 en ausencia de HGF

Dosis del anticuerpo (ng/ml)	CPM PROM.									
	hlG2	D11-8B8	D11-27G3	D11-S17Y	hlG4	C8-co16	C8-H241	C8-6	mlG	5D5
20000,0	14658	15866	16054	18616	13704	13112	12797	13194	14224	19893
3333,3	14034	15730	15765	17897	13023	13829	12702	13193	13469	19018
555,6	14048	13997	14536	16620	12393	11359	12116	13494	13200	20043
92,6	14113	13705	14718	15342	12934	11563	12142	12793	13761	15588
15,4	14473	13488	13836	14579	13271	12111	13020	13670	13638	11748
2,6	15517	14097	13325	14867	13858	13713	14407	14126	13766	12520
0,4	14341	14411	13596	14618	13412	14080	14142	14601	14357	12896
0,1	16947	15319	17690	15899	13547	15567	15530	16121	13797	14383
0,0	14992	14992	15237	15237	14622	13889	14622	13889	14531	14531
Err. est.										
20000,0	398	737	549	345	219	642	268	96	465	807
3333,3	358	959	538	466	84	1086	380	382	927	954
555,6	343	809	705	284	478	437	216	4	397	505
92,6	428	502	728	237	447	292	445	212	706	394
15,4	232	737	729	160	487	267	305	107	514	318
2,6	386	173	295	404	339	299	291	711	91	221
0,4	357	568	508	392	317	556	656	281	331	323
0,1	262	550	1108	326	381	601	583	536	229	145
0,0	310	310	394	394	364	554	364	554	238	238
Abreviaturas: PROM= promedio; CPM = cuentas por minuto; Err. est. = error estándar										

- Estos datos demuestran que los anticuerpos de c-Met C8-H241, C8-6, C8-co-16, y D11-8B8 no aumentan significativamente la captación de timidina-[metil-³H] en las células Caki-1 en comparación con la de los controles de isotipo IgG. D11-C27G3 y D11-S17Y exhiben una baja, variable, aunque estadísticamente significativa, estimulación de la captación de timidina-[metil-³H] en las células Caki-1 en comparación con la del control de isotipo IgG. El anticuerpo agonista de control de c-Met 5D5 induce una captación de timidina [metil-³H] más fuerte que la de los presentes anticuerpos de c-Met en células Caki-1 en las mismas condiciones experimentales.

Ejemplo 12

Actividad agonista de los anticuerpos en hepatocitos humanos primarios en ausencia de HGF

- La actividad agonista de los presentes anticuerpos de c-Met se evalúa adicionalmente en hepatocitos humanos primarios (PHH), que responden a HGF en ausencia de HGF.
- Células PHH criopreservadas que se pueden sembrar en placas (KQG Celsis, Chicago, IL, RD # 00002) se descongelan a 37 °C y se resuspenden a 175.000 células / ml en medio InVitroGRO CP (Celsis, # Z99029) con la mezcla de antibióticos torpedo (Celsis, # Z99000). Se añaden 0,2 ml de células PHH resuspendidas por pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos revestidos con colágeno I (BD, Franklin Lakes, NJ, # 354407) en 35.000 células / pocillo, y las células se incuban durante 24 horas a 37 °C, 5 % (v / v) de CO₂. Después se aspira el medio de cultivo es y se añaden 150 µl por pocillo de medio InVitroGRO HI (Celsis, # Z99009) con la mezcla de antibiótico torpedo más 0,1 % (p / v) de BSA más 50 µl de anticuerpos de c-Met y de control en un intervalo de concentración final de 10 µg/ml a 0,0032 µg / ml o HGF a una concentración final de 200 ng / mL, en medio InVitroGRO HI con la mezcla de antibiótico torpedo más 0,1 % (p / v) de BSA. Las células se incuban durante 48 horas a 37 °C, 5 % (v / v) de CO₂ y se añaden 10 µl de 0,1 mCi de timidina- [metil-³H] / ml (MP Biomedicals, Solon, OH, # 24066) por pocillo durante las últimas 6 horas de incubación. Las placas de ensayo se congelan a -70 °C, se descongelan a 37 °C y se cosechan en placas UniFilter-96 GF / C (Perkin Elmer, Waltham, MA, # 6005174) utilizando una cosechadora Filtermate Harvester (Perkin Elmer). Las placas Unifilter se secan, se añaden 20 µl de líquido de centelleo Microscint 0 (Perkin Elmer, # 6013611) por pocillo, y las placas se cuentan en un contador de centelleo líquido 1450 Microbeta (Perkin Elmer).

La Tabla 14 muestra el promedio de los tratamientos por triplicado con desviaciones estándar, y es representativo de tres experimentos repetidos.

Tabla 14

Efecto de varios anticuerpos C8 y D11 en la incorporación de ³ H-timidina en hepatocitos humanos primarios en ausencia de HGF													
Dosis:													
Tratamiento con Ab	isotipo	10 µg/ml		2 µg/ml		0,4 µg/ml		0,08 µg/ml		0,016 µg/ml		0,0032 µg/ml	
		promedio	desv. est.	promedio	desv. est.	promedio	desv. est.	promedio	desv. est.	promedio	desv. est.	promedio	desv. est.
D11-8B8	IgG2	1703,7	140,1	1427,0	120,3	1231,0	232,4	1122, %	188,3	715,3	25,8	611,0	61,5
D11-C27G3	IgG2	2145,7	171,0	1874,0	443,4	1753,0	199,8	1283,3	131,6	892,0	109,3	692,7	23,0
D11-S17Y	IgG2	3155,0	594,2	2566,0	173,1	1911,0	348,3	1458,7	132,7	919,7	47,5	726,3	131,7
C8-H241	IgG4	671,0	61,0	710,3	81,8	681,3	13,7	669,3	77,0	630,0	37,2	625,0	65,5
C8-co-16	IgG4	952,0	36,0	822,0	88,4	670,0	23,3	767,3	12,6	715,7	12,5	828,7	85,2
C8-6	IgG4	1042,3	91,3	892,3	107,0	801,7	77,4	792,3	48,4	769,7	109,9	736,3	43,1
5D5	mIgG1	4978,0	59,9	4912,3	287,7	3763,7	292,1	3320,7	40,1	1716,3	324,1	821,7	175,3
hlgG2	Control del isotipo	650,0	39,4	643,7	11,7	711,7	16,6	836,0	61,0	748,3	57,7	799,7	80,3
hlgG4	Control del isotipo	647,3	77,1	735,0	33,8	717,3	19,4	819,0	44,2	848,3	75,1	806,7	79,7
mIgG1	Control isotipo	616,7	24,8	581,0	81,8	601,0	82,0	596,0	78,6	588,7	43,0	675,0	73,0
Prom. desv. est.													
HGF	200 ng/ml	6292,7	733,0										
Sin tratar		615,1	83,9										

Los datos demuestran que en comparación con los controles de isotipo IgG, los presentes anticuerpos de c-Met C8-H241 no aumentan significativamente la captación de timidina-[metil-³] en células PHH; C8-6, C8-co-16, D11-8B8, D11-C27G3 y D11-S17Y exhiben una estimulación baja, variable, pero estadísticamente significativa de la captación de timidina- [metil-³H]. Sin embargo, la actividad agonista de los presentes anticuerpos de c-Met es significativamente menor que la del anticuerpo de c-Met control 5D5. El anticuerpo agonista 5D5 estimula la proliferación de PHH de una manera dependiente de la dosis, con un aumento de 5 veces a una concentración de 3 μ / ml. A 200 μ g / ml, HGF estimula un aumento de 5 veces la captación de ³H-timidina. El Mab C8-H241 no induce la proliferación ni cuando se utiliza a 10 μ g / ml.

Se obtienen resultados similares en células epiteliales renales humanas HK2, que también proliferan en respuesta a la estimulación con HGF.

Ejemplo 13

Efecto de los anticuerpos sobre la morfogénesis tubular en las células HepG2 en ausencia de HGF

HGF induce cambios morfológicos tubulares en las células HepG2 cultivadas en Matrigel™ (Becton-Dickinson, # 354 234), un material de matriz extracelular que contiene componentes de la membrana basal. En este experimento, se evalúa la actividad agonista de tipo HGF de los anticuerpos de la presente invención en la inducción de cambios morfológicos tubulares en las células HepG2.

Las células HepG2 (ATCC, # HB-8065) se cultivan en medio DMEM suplementado con 10 % de FBS. 100 μ l de una solución Matrigel™ (Matrigel™, Becton-Dickinson) diluido en Opi-MEM (Invitrogen, # 31985) suplementado con 10 % (v / v) de FBS, L-glutamina 2 mM (Invitrogen, # 25030), 100 U / 500 ml de penicilina G y 100 μ g / 500 ml de estreptomicina (Invitrogen, # 15140) se siembran en pocillos de placas de 96 pocillos de cultivo tisular (Costar, # 3596). Una vez que la solución Matigel™ solidifica se añaden 2000 células HepG2 en 50 μ l de medio de cultivo suplementado con 10 % de suero. A continuación, a las células se añaden los anticuerpos c-Met y de control a una concentración final de 50 μ g / ml o HGF a una concentración final de 50 ng / ml. Las células se cultivan durante 4 días a 37 °C en una atmósfera humidificada que contiene 5 % (v / v) de CO₂. Después de 4 días, se retira el medio de la parte superior y se reemplaza con 50 μ l de 1 mg / ml de p-yodonitro-tetrazolio violeta (Sigma, # 18377) en PBS, y las células se incuban durante otras 48 horas en las mismas condiciones. Se toman fotografías del área teñida de 32 mm y se analizan utilizando Image-Pro Plus 6 (Media Cybernetics, Inc., MD).

Los datos de un experimento representativo, para anticuerpos a 50 μ g / ml, se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15

Efecto de los anticuerpos C8 en la morfogénesis tubular en células HepG2							
Anticuerpo (50 μ g/ml)	hlgG4	C8-H241	C8-co16	C8-6	mlgG	5D5	NGF (50 ng/ml)
Morfogénesis tubular	Sin estimulación	Sin estimulación	Sin estimulación	1,2	1,2	4,9	5,4
Actividad agonista							
(estimulación)							

Estos datos demuestran que el HGF y el anticuerpo agonista de control 5D5 inducen cambios morfológicos tubulares POR aproximadamente 5 veces en las células HepG2 en comparación con el control de isotipo. En contraste, los presentes anticuerpos de c-Met C8-H241 y C8-co16 no inducen cambios morfológicos tubulares significativos en las células HepG2 en las mismas condiciones, mientras que el anticuerpo de c-Met C8-6 induce sólo un bajo nivel de estimulación.

Se obtienen resultados similares con el Mab D11-8-B8.

Ejemplo 14

Efecto de los anticuerpos en la motilidad celular: Ensayo de dispersión con DU145 y ensayo de raspado celular H441

Tras la estimulación con HGF, las células de cáncer de próstata DU145 se disocian unas de otras y células H441

llenar un raspado hecho en una capa de células confluentes. Las células H441 exhiben un alto nivel de expresión de c-Met y fosforilación constitutiva de este receptor, pero todavía responden a HGF. Los siguientes experimentos evalúan el efecto agonista de los anticuerpos de la presente invención sobre la motilidad celular en un ensayo de dispersión y un ensayo de raspado.

5 Ensayo de dispersión de células DU145

Las células DU 145 (ATCC, # HTB-81) cultivadas en medio MEM (Invitrogen, # 11095) + 10 % de FBS (Invitrogen, # 10082) a 37 °C en 5 % (v / v) de CO₂ se siembran a 2×10^3 células / pocillo en 70 µl de volumen en placas negras de 96 pocillos ViewPlate (Perkin Elmer, Waltham, MA, # 6005182) y se incuban durante la noche a 37 °C en 5 % (v / v) de CO₂. Los anticuerpos de c-Met y control se diluyen en el medio de cultivo celular y se añaden a una concentración final de 20 µg / ml, y se añade HGF a una concentración final de 20 ng / ml, cada uno en 30 µl de volumen con doce repeticiones, y se incuban durante 48 horas a 37 °C en 5 % (v / v) de CO₂. Después se aspira el medio y las células se fijan en 2 % de formaldehído durante 15 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron tres veces con PBS, y se añaden 50 µl de 5 U / ml de Alexa Fluor 488 faloidina (Invitrogen, # A12379) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los pocillos se lavan tres veces con PBS y se añaden 50 µl de yoduro de propidio 15 µM (Invitrogen, # P3566). La placa se lee posteriormente en un citómetro de microplacas de fluorescencia de barrido láser Acumen Explorer™ (TTP Labtech Ltd, Cambridge, MA) usando el software Jockyss con el fin de determinar el porcentaje de células DU145 en colonias.

Los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16

Efecto de los anticuerpos en C8– y D11 en la dispersión celular DU145									
	Porcentaje de células DU145 en colonias								
	C8–H241	C8–6	C8–co–16	hlgG4	D11–8B8	hlgG2	5D5	HGF	Sin tratar
Promedio	24,13	23,29	23,69	24,41	25,57	25,67	14,45	8,15	26,53
Desv. Típica	3,35	1,37	2,30	2,02	1,98	3,13	0,34	1,23	2,44

Los datos demuestran que el Mab agonista de c-Met 5D5 y HGF, pero no los Mab de c-Met C8-H241, C8-co-16, C8-6, o D11-8B8, estimulan significativamente la dispersión/motilidad de las células DU145.

Ensayo de raspado celular H441

Para el ensayo de raspado H441, las células H441 (ATCC, # HTB-174) se cultivan en medio RPMI-1640 (Invitrogen, # 11835); 10% (v / v) de FBS (Invitrogen, # 10082); L-glutamina 2 mM (Invitrogen, # 25030); 100 U / 500 ml de penicilina G, y 100 µg / 500 ml de estreptomycin (Invitrogen, # 15140)), y se siembran a 1×10^6 células / 2 ml / pocillo en placas de cultivo tisular de 6 pocillos (Costar, # 3598) en el medio de cultivo. Las placas se incuban durante 3 días con 95 % de humedad relativa y 5 % (v / v) de CO₂. Después se aspira el medio y las células se dejan sin alimentos en medio bajo en suero (0,5 % (v / v) de FBS en medio RPMI) durante 16 horas. Las capas de células confluentes en el fondo de los pocillos se raspan con las puntas de las pipetas de 5 ml en medio de cada pocillo y se aspiran las células que flotan. Las células restantes se lavan 1 vez con medio bajo en suero. Se añade medio bajo en suero y se obtienen imágenes de las zonas raspadas usando un microscopio de campo claro con un objetivo 4X. Estos huecos se definen como Huecos a 0 horas.

Los anticuerpos de ensayo se añaden a las células a una concentración final de 10 µg / ml, seguido de incubación a 37 °C en 5% de CO₂ (v/v) durante 16 horas. El HGF se ensaya a una concentración final de 200 ng / ml. Cada grupo de tratamiento se analiza al menos en pocillos duplicados. De nuevo se obtienen imágenes de las áreas raspadas usando un microscopio de campo claro a las 16 horas. Estos huecos se definen como Huecos a 16 horas.

El efecto de los anticuerpos de c-Met o de HGF sobre el movimiento de las células H441 para llenar los huecos se calcula como sigue:

Porcentaje de cambio promedio=

Grupo de tratamiento (hueco a 0 horas – Hueco a 15 horas) x 100

Grupo de medio promedio (hueco a 0 horas – Hueco a 16 horas)

Los resultados se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17
Efecto de los anticuerpos C8 en el Ensayo de raspado H441

Anticuerpo (10 µg/ml)	Promedio %	Desv. Est.
Medio	100	7
hIgG4	98	9
C8-H241	98	9
C8-6	102	4
mIgG1	98	18
Mab 5D5	244	4
HGF (200 ng/ml)	364	9

Los datos demuestran que el agonista de c-Met Mab 5D5 y HGF estimulan el movimiento de las células H441 / para rellenar las zonas raspadas. En las mismas condiciones, los Mab de c-Met C8-H241 y C8-6 no estimulan la motilidad de las células H441.

Ejemplo 15

Efecto de los anticuerpos de c-Met sobre la invasividad de las células HepG2

Los anticuerpos agonistas de c-Met y HGF estimulan invasión de las células portadoras de c-Met. En este ejemplo se examina la actividad agonista de los presentes anticuerpos de c-Met en un ensayo de invasión celular empleando células HepG2, que responden a HGF en un ensayo de invasión.

Las células HepG2 (ATCC, # H-8065) se dejan sin alimentar durante la noche en medio MEM libre de suero (Invitrogen, # 11095) y después se añaden 5×10^4 células en un volumen total de 500 µl a cada pocillo de la cámara superior de una cámara de invasión de Matrigel (BD, Franklin Lakes, NJ, # 354483), en la que la cámara inferior contiene anticuerpos en un volumen total de 750 µl de medio libre de suero a una concentración de 10 µg / ml, o HGF a 50 ng / ml en medio libre de suero, seguido de incubación durante cuarenta y ocho horas a 37 °C en 5 % (v / v) de CO₂. Las células no invasoras se retiran de la cámara superior con un hisopo, seguido de fijación de la membrana con etanol al 95 % y tinción con 0,2 % (p / v) de violeta cristal. Después del lavado y secado, el número de células invasoras se cuenta utilizando el software Image-Pro Plus 6 Manual Tag (Media Cybernetics, Inc. , MD) de análisis de fotografías tomadas de las células teñidas con un objetivo 2,5X.

Los resultados se resumen en la Tabla 18.

Tabla 18

Efecto de los anticuerpos C8, C8, y D11 en la invasividad de las células HepG2								
Concentración del anticuerpo HlgG4 (µg/ml)	Número de células promedio por 2,5 x campo							
		C8-H241	C8	mIgG1	optD11	5D5	HGF (50 ng/ml)	Medio
10,00	5,5	3,5	4,3	5,5	19,8	85,0	509,5	3,5
	Err. est.							
	0,5	0,9	1,3	0,5	4,1	20,4	4,5	0,5

Los datos demuestran que el Mab agonista de c-Met y 5D5 y HGF, pero no los Mab de c-Met C8-H241 y C8 (murino)

estimulan la invasión de HepG2. El Mab de c-Met murino optD11 induce débilmente la invasión de células HepG2.

Ejemplo 16

Los anticuerpos C8– and D11no protegen a las células Caki–1 de la apoptosis inducida por estaurosporina

Los anticuerpos de c-Met agonista y HGF protegen a las células de la muerte celular inducida por estaurosporina. Este ejemplo examina la actividad agonista de los anticuerpos DE c-Met de la presente invención en un ensayo de la apoptosis inducida por estaurosporina usando células Caki-1 que responden a HGF.

Las células Caki-1 (ATCC, # HTB-46) se cultivan como se describe en el Ejemplo 11, se siembran a 1×10^4 células / pocillo en placas de 96 pocillos (Costar, # 3596) en medio de cultivo, y se pretratan con anticuerpos (diluidos desde 30.000 ng / ml a 3 ng / ml en el medio de cultivo celular), o HGF (diluido desde 225 ng / ml a 0,02 ng / ml), durante una hora, seguido de tratamiento con estaurosporina 0,1 μ M (concentración final) durante cuarenta y ocho horas a 37 °C. El medio se aspira y las células se lisan durante 30 minutos con 0,2 ml del componente de tampón de lisis del kit ELISA de detección de muerte celular (Roche Applied Science, Indianápolis, IN, #11774425001). Este kit utiliza 20 μ l de cada lisado para medir la muerte celular mediante la detección de fragmentos de ADN asociados a histonas citoplásmicas según lo determinado por la absorción a 450 nm. Una densidad óptica a 450 nm más alta indica una mayor apoptosis.

Los resultados mostrados en la Tabla 19 demuestran que el HGF, pero no los Mab de c-Met C8-H241, C8-6, y D11-8B8, protege a las células Caki-1 de la apoptosis inducida por estaurosporina.

Tabla 19

Efecto de los anticuerpos de c-Met sobre la apoptosis inducida por estaurosporina en células Caki-1								
Dosis del anticuerpo (ng/ml)	A450 nm promedio							
	hlgG4	C8–H241	C8–6	HGF	hlgG2	D11–8B8	Medio	ESTS*
3	0,95	0,83	1,09	0,97 (0,02 ng/ml)	0,95	1,02	0,24	0,87
30	0,98	0,84	1,02	0,93 (0,23 ng/ml)	0,91	0,91		
300	0,87	0,86	0,97	0,73 (2,25 ng/ml)	0,95	0,81		
3000	0,98	0,85	0,92	0,58 (22,5 ng/ml)	0,95	0,91		
30000	0,91	0,90	0,96	0,45 (225 ng/ml)	0,94	0,87		
	Err. est.							
3	0,03	0,02	0,19	0,02	0,07	0,01	0,01	0,03
30	0,03	0,01	0,14	0,06	0,00	0,11		
300	0,10	0,03	0,06	0,03	0,02	0,02		
3000	0,04	0,01	0,12	0,01	0,06	0,02		
30000	0,00	0,01	0,13	0,06	0,04	0,03		
*ESTS: Estaurosporina								

Ejemplo 17

Efecto de los anticuerpos C8 sobre la angiogénesis

Los anticuerpos agonistas de c-Met y HGF estimulan la angiogénesis. Los anticuerpos de c-Met de la presente invención se evalúan para esta propiedad agonista funcional en el ensayo de formación de tubos de cocultivo de CMTA / CFCE. Las células madre derivadas de tejido adiposo (CMTA) expresan HGF; las células formadoras de colonias endoteliales (CFCE) tubos de formulario en respuesta a la estimulación por HGF.

Las ADCS (Lonza, Allendale, NJ, # PCT-5006) de disocian, se resuspenden en medio basal (medio MCDB-131 (Sigma, St. Louis, MO #M8537)) + 30 µg/ml de ácido L-ascórbico-2-fosfato (Sigma #A8960), dexametasona 1 µM (Sigma #D4902), 50 µg/ml de tobramicina (Sigma #T4014), 10 µg/ml de cebador celular-transferrina AF (Millipore #9701) + 10 µg/ml de nucelina (insulina recombinante humana de Lilly)), se siembran a 4×10^4 células / pocillo en placas de 96 pocillos y se incuban durante la noche a 37 °C en 5 % (v/v) de CO₂. El medio se aspira y se añaden 500 µg/ml de heparina sódica (Sigma, # H3393) en medio basal a 100 µl / pocillo; las células se incuban después durante 1 hora a 37 °C. Los pocillos se aspiran, lavan una vez con 100 µl medio basal, y se agregan CFCE como sigue: CFCE

(EndGenitor Technologies, Inc., Indianápolis, IN #EGT-CFCE100506) se disocian, se lavan en medio basal, se resuspenden en medio basal, y se añaden a 4×10^3 células / pocillo en la parte superior de CMTA placas de 96 pocillos. Después de 4 horas de incubación a 37 °C, HGF y los anticuerpos se diluyen en el medio de cultivo celular y se añaden a pocillos separados en las siguientes concentraciones finales: HGF:100 ng/ml; anticuerpos: 10 µg/ml. El anticuerpo GHF (R&D Systems #AB-294-NA) también se añade a una concentración final de 10 µg/ml. Las células se incuban durante 4 días adicionales a 37 °C. Los pocillos se aspiran y se añaden 100 µl / pocillo de 1 % de paraformaldehído, seguido de incubación durante 20-30 minutos. Las células se lavan tres veces con PBS-BSA (0,1 % de BSA, Invitrogen # 15260-037) y se tratan con 50 µl de 1 µg / ml de anticuerpo CD31 anti-humano (R & D Systems, # AF806) durante 1 hora a 37 °C o durante la noche a 4 °C. Las células se lavan dos veces con PBS-BSA y se tratan con 50 µl de 4 µg / ml de IgG anti-oveja conjugado con AlexaFluor488 (Invitrogen, # A11015) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavan dos veces con PBS-BSA y se tiñen con 100 µl de colorante Hoechst3342 y se leen en un Cellomics ArrayScan (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Se usa el software VHCS View Versión 1, 4.6 para determinar las áreas tubulares totales, que se utilizan para evaluar el efecto de los diversos anticuerpos y el HGF sobre la estimulación de la angiogénesis.

Los resultados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20

Efecto de los anticuerpos C8 sobre la formación de tubos en células CFC								
Área total del tubo								
	Medio basal	hIgG4	C8-H241	C8-6	mIgG1	5D5	HGF Ab	HGF
Promedio	67753,3	90134,3	22979,7	65224,0	125538,3	147237,3	22824,3	212104,7
Desv. Est.	24221,6	17741,1	604,9	18275,9	34702,4	18748,1	6586,0	16588,5

Los resultados demuestran que C8-H241 y C8-6 no estimulan la formación de tubos en comparación con el medio o sus anticuerpos de control de isotipo correspondientes, mientras que HGF y el Mab agonista 5D5 estimulan significativamente la formación de tubos.

Ejemplo 18

inhibición del crecimiento de células tumorales dependiente de HGF e independiente de HGF en modelos de xenoinjerto

La inhibición del crecimiento de células tumorales dependiente de HGF e independiente de HGF por los anticuerpos c-Met de la presente invención se examina en ensayos in vivo que emplean modelos de xenoinjerto de ratón de células MKN45 y U87MG (glioblastoma humano), respectivamente. Las células MKN45 expresan constitutivamente niveles altos de c-Met y fosforilación de c-Met en ausencia de HGF. Las células U87MG secretan HGF de una manera autocrina y responden a HGF.

Las células MKN45 (Japan Health Sciences Foundation, Health Science Research Resource, #JCRB0254) se expanden en cultivo como se describe en el Ejemplo 8, se digieren con tripsina en células individuales, se cosechan, y se resuspenden en PBS. Dos millones de células MKN45 en PBS se inyectan subcutáneamente en el flanco trasero de ratones desnudos atímicos (Harlan, Indianápolis, IN). Los anticuerpos de c-Met y los anticuerpos IgG2 y IgG4 correspondientes se diluyen en PBS, pH 7,2, y se administran una vez a la semana por inyección intravenosa a partir de 3 o 7 días después de la implantación de las células tumorales en 1, 5, o 20 mg / ml. La inhibición del crecimiento de las células tumorales se determina por medición mediante compás tridimensional de los volúmenes tumorales dos veces a la semana durante el curso del tratamiento. El peso corporal se mide como una medición general de la toxicidad.

Las células U87MG (ATCC # HTB-, 14) se cultivan en MEM (Invitrogen, # 11095) a 37 °C, se expanden en cultivo, se digieren con tripsina, se cosechan y se resuspenden en PBS (Invitrogen, # 14190). Cinco millones de células se

inyectan por vía subcutánea en el flanco trasero de ratones desnudos atímicos (Harlan, Indianápolis, IN). Los anticuerpos de c-Met se diluyen en PBS, y se administran una vez a la semana por inyección intravenosa a las dosis indicadas en la Tabla 22 a partir de 7 días después de la implantación de células tumorales. El anticuerpo control IgG4 se administra a 10 mg/kg. La inhibición del crecimiento de las células tumorales se determina por medición mediante compás tridimensional de los volúmenes tumorales dos veces a la semana durante el curso del tratamiento. El peso corporal se mide como una medición general de la toxicidad.

La eficacia antitumoral de cuatro anticuerpos, D11-8B8, C8-H241, C8-6, y C8-Co-16 en el modelo de xenoinjerto de células MKN45 se resume en la Tabla 21. "% de inhibición máxima" representa el porcentaje de inhibición del crecimiento del tumor en comparación con el tratamiento con el anticuerpo de control correspondiente (inhibición 0 %).

Cuando se administran dosis de 5 mg / kg o 20 mg / kg, los cuatro anticuerpos de c-Met producen una inhibición significativa del crecimiento de las células tumorales MKN45 en comparación con sus correspondientes controles de isotipo IgG.

Tabla 21

Efecto de los anticuerpos C8- y D11 sobre el crecimiento tumoral independiente de HGF de MKN45 <i>in vivo</i>			
Anticuerpo	Nivel de dosis (mg/kg)	% inhibición máxima	Valor p
D11-8B8	5	53	p<0,05
	20	56	p<0,01
C8-H241	1	39	NS
	5	63	p<0,01
	20	51	p<0,05
C8-6	1	60	p<0,001
	5	59	p<0,01
	20	73	p<0,001
C8-Co-16	1	36	NS
	5	60	p<0,001
	20	85	p<0,001

Una inhibición dependiente de la dosis del crecimiento de células tumorales por C8-H241 también se observa en el modelo de xenoinjerto de células U87MG dependiente de HGF, tal como se resume en la Tabla 22. "% de inhibición máxima" representa el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral en comparación con el tratamiento con el anticuerpo de control correspondiente IgG4 (inhibición del 0 %).

Tabla 22

Efecto del anticuerpo C8-H:241 sobre el crecimiento tumoral U87MG independiente de HGF <i>in vivo</i>			
Anticuerpo	Nivel de dosis (mg/kg)	% inhibición máxima	Valor p
C8-H241	0,1	45,2	NS
C8-H241	0,3	86,8	p<0,001
C8-H241	1	91,9	p<0,001
C8-H241	3	91	p<0,001
C8-H241	10	94,8	p<0,001

A 5 y 20 mg / kg, el anticuerpo C8-H241 también inhibe el crecimiento del tumor de xenoinjerto de cáncer de pulmón no microcítico H441 un 58% y 60%, respectivamente. Las células H441 exhiben un alto nivel de expresión de c-Met y fosforilación constitutiva de c-Met, pero todavía son sensibles a HGF.

Ejemplo 19

5 Reducción de anticuerpos de c-Met Total y fosforilado en tumores de xenoinjerto MKN45

La actividad *in vivo* del anticuerpo de c-Met C8-H241 sobre el c-Met total y c-Met fosforilado en ratones portadores de tumores de xenoinjerto MKN45 (independiente de HGF) se investiga en este ejemplo. Se observa una reducción dependiente de la dosis de c-Met total y c-Met fosforilado (en la tirosina 1349) 24 horas después de la administración del anticuerpo.

- 10 Las células MKN45 se expanden en cultivo como se describe en el Ejemplo 8, se digieren con tripsina y se cosechan. Dos millones de células MKN45 en PBS se inyectan subcutáneamente en el flanco trasero de ratones desnudos atímicos (Harlan, Indianápolis, IN). El anticuerpo frente a c-Met C8-H241 se diluye en PBS, a pH 7,2, y se administra por inyección intravenosa ocho días después de la implantación de células tumorales en 2,5, 5, 10, 20, y 40 mg / kg. El anticuerpo control hIgG4 se administra a 40 mg / kg. Después de 24 horas de tratamiento, se eliminan los tumores, se someten a congelación ultrarrápida, se almacenan temporalmente en -80 °C, y se lisan en tampón de lisis (ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5 mM, etilenglicol-bis (b-aminoetil) -N, N, N', N'-tetraacético (EGTA) 5 mM, HEPES 50 mM, 20 mM de pirofosfato de sodio (ThermoFisherScientific, # S390-500), NaCl 150 mM, NaF 20 mM, 1% (v / v) octilfenoxi polietoxi etanol (TRITON®-X 100), inhibidor de proteasa completo, sin EDTA (Roche, Basilea, Suiza, # 1836153) cóctel de inhibidores de fosfatasa I (Sigma # P2850), y el inhibidor de la fosfatasa cóctel II)).

ELISA de c-Met total

- Para el ELISA de c-Met total, un anticuerpo de captura de c-Met se diluye en tampón de revestimiento Bup H (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, # 28382) a 2 µg/ml. Se añaden 100 µl de anticuerpo diluido por pocillo a placas de ELISA (ThermoFisherScientific, Waltham, MA # 439454), y las placas se incuban durante la noche a 4 °C.
- 25 Los pocillos se aspiran, se lavan dos veces con TBS-T, y después se bloquean con 200 µl de tampón de bloqueo (TBS-T más 2 % (p / v) de BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan dos veces con TBS-T. A continuación, las diluciones de los lisados tumorales o el dominio extracelular de c-met (aminoácidos 25-932 de SEC ID Nº 75) se añaden, y las placas se incuban durante la noche a 4 °C. Las placas se lavan a continuación tres veces con TBS-T. A continuación, a cada pocillo se añaden 100 µl de 0,5 mg / ml de Mab 5D5 biotinilado (como
- 30 segundo anticuerpo frente a c-Met que se une a un epítipo de c-Met diferente del anticuerpo de captura) diluido en tampón de bloqueo y las placas se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavan tres veces con TBS-T. Después se añaden 100 µl de estreptavidina conjugada con peroxidasa (diluida a 1/10.000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, # 016-030-484) en tampón de bloqueo y la mezcla se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan a continuación tres veces con TBS-T.
- 35 Se añaden 100 µl de solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (BioFX, # TMBW-1000/01) a cada pocillo, seguido por la adición de 100 µl de solución de parada (BioFX, # LSTP-1000/01). Las placas se leen a 450 nm usando un lector de placas SpectraMax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) con el software SOFTmax Pro 3. 1. 2 (Molecular Devices).

ELISA de c-Met fosforilado

- 40 Para el ELISA de fosfo-c-Met total, un anticuerpo de captura de c-Met se diluye en tampón de revestimiento Bup H (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, # 28382) a 2 µg/ml. Se añaden 100 µl de anticuerpo diluido por pocillo a placas de ELISA (ThermoFisherScientific, Waltham, MA # 439454), y las placas se incuban durante la noche a 4 °C. Los pocillos se aspiran, se lavan dos veces con TBS-T, y después se bloquean con 200 µl de tampón de bloqueo (TBS-T más 2 % (p / v) de BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan dos veces con TBS-T.
- 45 A continuación, se añaden los lisados de células MKN45 y las placas se incubaron durante la noche a temperatura ambiente. Las placas se lavan a continuación tres veces con TBS-T. Después, a cada pocillo se añaden 100 µl de 0,5 µg/ml de anticuerpo anti-pY1349 c-Met (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, # 3121) diluido en tampón de bloqueo y las placas se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavan tres veces con TBS-T. Después se añaden 100 µl de IgG anti-conejo conjugada con peroxidasa (diluida a 1/10.000 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, # 111-035-144) en tampón de bloqueo y la mezcla se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavan a continuación tres veces con TBS-T.
- 50 Se añaden 100 µl de solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (BioFX, # TMBW-1000/01) a cada pocillo, seguido por la adición de 100 µl de solución de parada (BioFX, # LSTP-1000/01). Las placas se leen a 450 nm usando un lector de placas SpectraMax 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) con el software SOFTmax Pro 3. 1. 2 (Molecular Devices).

Los resultados se muestran en la Tabla 23.

Los datos demuestran que el tratamiento *in vivo* de tumores de xenoinjerto MKN45 con el Mab C8-H241 durante 24 horas reduce al máximo el c-Met total en aproximadamente un 43 %, el c-Met fosforilado en aproximadamente un 73

%, en estas condiciones.

Tabla 23

Reducción de c-Met total y fosforilado en tumores de xenoinjerto MKN45 después del tratamiento 24 horas con el anticuerpo de c-Met C8-H241 <i>in vivo</i>							
Reducción de c-Met total							
% de inhibición		C8-H241					hlgG4
	PBS	2,5 mpk	5 mpk	10 mpk	20 mpk	40 mpk	40 mpk
% inhibición promedio	-88,51	-8,43	4,26	25,07	42,85	30,62	0,00
% inhibición desv. est.	62,63	-8,43	36,84	26,88	17,67	35,95	41,23
Reducción de c-Met fosforilado							
% de inhibición		C8-H241					hlgG4
	PBS	2,5 mpk	5 mpk	10 mpk	20 mpk	40 mpk	40 mpk
% inhibición promedio	12,16	22,89	17,56	53,21	67,04	73,42	0,00
% inhibición desv. est.	23,89	22,89	37,05	9,90	6,58	7,04	48,81
mpk: mg/kg							

Secuencias de aminoácidos y nucleótidos

5 Secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera

D11-S17Y (SEC ID N° 1)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCSVSSISSTNLHWYQQKPGQAPRLLIYGTSYLAS
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFGQGKLEIK

D11-8B8 (SEC ID N° 2)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCSVSSISSTNLHWYQQKPGQAPRLLIYGTSYLAS
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFGQGKLEIK

D11-C27G3 (SEC ID N° 3)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCSVSSISSTNLHWYQQKPGQAPRLLIYGTSRLRS
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFGQGKLEIK

C8-6 (SEC ID N° 4)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSVSSSVSSIYHLHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLAS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCIQYSGYPLTFGGGKVEIK

C8-H241 (SEC ID N° 5)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSSVSSIYLHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLAS
GVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQVYSGYPLTFGGGKVEIK

C8-co-16 (SEC ID N° 6)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSSVRSIYLHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLA
SGVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQVYRGYPLTFGGGKVEIK

5

Secuencias de ácidos nucleicos de la región variable de la cadena ligera

D11-S17Y (SEC ID N° 7)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
CTCTCCTGCAGTGTGAGCTCAAGTATAAGTTCCACCAACTTACACTGGTACCAGCAGAAA
CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGCACATCCTATCTGGCTTCTGGCATCCCA
GACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACAGTTTCGGC
CAAGGGACCAAGTTGGAGATCAAA

10

D11-8B8 (SEC ID N° 8)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
CTCTCCTGCAGTGTGAGCTCAAGTATAAGTTCCACCAACTTACACTGGTACCAGCAGAAA
CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGCACATCCTACCTGGCTTCTGGCATCCCA
GACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACAGTTTCGGC
CAAGGGACCAAGTTGGAGATCAAA

D11-C27G3 (SEC ID N° 9)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
CTCTCCTGCAGTGTGAGCTCAAGTATAAGTTCCACCAACTTACACTGGTACCAGCAGAAA
CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGCACATCCAGACTGAGATCTGGCATCCCA
GACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACAGTTTCGGC
CAAGGGACCAAGTTGGAGATCAAA

15

C8-6 (SEC ID N° 10)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGAGTGTGAGCTCAAGTATAAGTTCCATTTACTTGCACTGGTATCAGCAGAAA
CCAGGGAAAGCCCCAAGCTCCTGATCTATAGCACATCCAAGTTGGCTTCTGGAGTCCCA
TCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAA
CCTGAAGATTTTGCACCTTACTACTGTATTAGTACAGTGGTTACCCGCTCACGTTTCGGC
GGAGGGACCAAGTTGGAGATCAAA

C8-H241 (SEC ID N° 11)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCACTGTCAGCTCAAGTGTAAGTTCCATTTACTTGCACTGGTATCAGCAGAAA
CCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCA
TCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAA
CCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAGGTGTACAGTGGTTACCCGCTCACGTTCTGGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

5 C8-co-16 (SEC ID N° 12)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCACTGTCAGCTCAAGTGTAAGTTCCATTTACTTGCACTGGTATCAGCAGAAA
CCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCA
TCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAA
CCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAGGTGTACAGGGTTACCCGCTCACGTTCTGGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

Secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada

D11-S17Y (SEC ID N° 13)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSRYPHWVRQAPGQGLEWMGWIYP
VTGDTYYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGAFYYW
GQGLVTVS

D11-8B8 (SEC ID N° 14)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSRYPHWVRQAPGQGLEWMGWIYP
VTGDTYYIEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGAFYYWG
QGLVTVS

15 D11-C27G3 (SEC ID N° 15)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSRYPHWVRQAPGQGLEWMGWIYP
VTGDTYYREPFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGAFYYWG
QGLVTVS

C8-6 (SEC ID N° 16)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGRV
NPNRGGTTYNQKFEGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARTNWLDY
WGQGTTVTVS

20 C8-H241 (SEC ID N° 17)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYYMHWVRQAPGQGLEWMGRV
NPNRRGTTYNQKFEGRVMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARANWLDY
WGQGTITVTVS

C8-co-16 (SEC ID N° 18)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDYYMHWVRQAPGQGLEWMGRV
NPYRGSTTYNQKFEGRVMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARANILDYW
GQGTITVTVS

5

Secuencias de ácidos nucleicos de la región variable de la cadena pesada

D11-S17T (SEC ID N° 19)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAGGTATATACACTGGGTGCGACAGGCC
CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTTATCCTGTAACTGGTGATACTTACTAC
AACGAGAAGTTCAAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTAC
GGAGCTTTTTTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCC

10

D11-8B8 (SEC ID N° 20)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAGGTATATACACTGGGTGCGACAGGCC
CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTTATCCTGTAACTGGTGATACTTACTAC
ATCGAGAAGTTCAAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTAT
GGTGCTTTTTTCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCC

D11-C27G3 (SEC ID N° 21)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAGGTATATACACTGGGTGCGACAGGCC
CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTTATCCTGTAACTGGTGATACTTACTAC
AGAGAGCCTTTCAAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTAT
GGGGCTTTTTTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCC

15

C8-6 (SEC ID N° 22)

CAGGTTCAAGCTGGTGCAGTCTGGTGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGTGCCTCAGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCGACTACTACATGCACTGGGTGCGTCAGGCC
CCTGGTCAAGGCTCTTGAGTGGATGGGTGCTGTTAATCCTAACCGGGGTGGTACTACCTAC
AACCAGAAATTCGAGGGCCGTGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGCGTAGCCTGCGTTCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGCGTACGAAC
TGGCTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTCACCGTCTCC

C8-H241 (SEC ID N° 23)

CAGGTTCAAGCTGGTGCAGTCTGGTGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGTGCCTCAGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCGACTACTACATGCACTGGGTGCGTCAGGCC
CCTGGTCAAGGCTCTTGAGTGGATGGGTGCTGTTAATCCTAACCGAGGGGTACTACCTAC
AACCAGAAATTCGAGGGCCGTGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGCGTAGCCTGCGTTCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGCGTACGAAC
TGGCTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTCACCGTCTCC

5

C8-co-16 (SEC ID N° 24)

CAGGTTCAAGCTGGTGCAGTCTGGTGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGTGCCTCAGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACATTCAGTACTACTACATGCACTGGGTGCGTCAGGCC
CCTGGTCAAGGCTCTTGAGTGGATGGGTGCTGTTAATCCTTATCGGGGTAGTACTACCTAC
AACCAGAAATTCGAGGGCCGTGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGCGTAGCCTGCGTTCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGCGTACGAAC
ATCTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTCACCGTCTCC

Secuencias de aminoácidos de la cadena ligera completa

10

D11-S17 kappa (SEC ID N° 25)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCSVSSISSTNLHWYQQKPGQAPRLLIYGTSYLAS
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFGQGQTKLEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

D11-8B8 kappa (SEC ID N° 26)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCSVSSISSTNLHWYQQKPGQAPRLLIYGTSYLAS
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFGQGQTKLEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

15

D11-C27G3 kappa (SEC ID N° 27)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCSVSSSISSTNLHWYQQKPGQAPRLLIYGTSRLRS
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFGQGTKLEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

C8-6 kappa (SEC ID N° 28)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSSVSSIYHWHYQQKPGKAPKLLIYSTSNLAS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCIQYSGYPLTFGGGTKVEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

5

C8-h241 kappa (SEC ID N° 29)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSSVSSIYHWHYQQKPGKAPKLLIYSTSNLAS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQVYSGYPLTFGGGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

C8-co-16 kappa (SEC ID N° 30)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSSVRSIYHWHYQQKPGKAPKLLIYSTSNLA
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQVYRGYPLTFGGGTKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Secuencias de ácidos nucleicos de la cadena ligera completa

D11-S17Y LC (SEC ID N° 31)

GAAATTGTGTGACGCAGTCTCCAGGCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
CTCTCCTGCAGTGTCAAGTATAAGTTCCACCACTTACACTGGTACCAGCAGAAA
CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGCACATCCTACCTGGCTTCTGGCATCCCA
GACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACAGTTTCGGC
CAAGGGACCAAGTTGGAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

15

D11-8B8 LC (SEC ID N° 32)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
 CTCTCCTGCAGTGTGAGCTCAAGTATAAGTTCCACCAACTTACACTGGTACCAGCAGAAA
 CCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGCACATCCTACCTGGCTTCTGGCATCCCA
 GACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
 CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACAGTTTCGGC
 CAAGGGACCAAGTTGGAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
 CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC

TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
 CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG
 ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
 GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

D11-C27G3 LC (SEC ID N° 33)

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
 CTCTCCTGCAGTGTGAGCTCAAGTATAAGTTCCACCAACTTACACTGGTACCAGCAGAAA
 CCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGCACATCCAGACTGAGATCTGGCATCCCA
 GACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAG
 CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACAGTTTCGGC
 CAAGGGACCAAGTTGGAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
 CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
 TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
 CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG
 ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
 GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

5

C8-6 LC (SEC ID N° 34)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
 ATCACTTGCAGTGTGAGCTCAAGTGTAAAGTTCCATTTACTTGCAGTGGTATCAGCAGAAA
 CCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATAGCACATCCAACTTGGCTTCTGGAGTCCCA
 TCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAA
 CCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTATTCAAGTACAGTGGTTACCCGCTCAGGTTTCGGC
 GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
 CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
 TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
 CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG
 ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
 GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

10

C8-H241 LC (SEC ID N° 35)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
 ATCACTTGCAGTGTGAGCTCAAGTGTATCCTCCATTTACTTGCAGTGGTATCAGCAGAAA
 CCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATAGCACATCCAACTTGGCTTCTGGAGTCCCA
 TCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAA
 CCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAAGTCTACAGTGGTTACCCGCTCAGGTTTCGGC
 GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
 CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
 TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
 CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG
 ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG
 GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

C8-co16 LC (SEC ID N° 36)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACC
ATCACTTGCACTGTGAGCTCAAGTGTACGTTCCATTTACTTGCACTGGTATCAGCAGAAA
CCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCA
TCAAGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAA
CCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTGAGGTGTACAGGGGTTACCCGCTCACGTTCCGC
GGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG
CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC
TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC
CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTCG
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGCCTGCCAAGTCACCCATCAG
GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGC

Secuencias de aminoácidos de la cadena pesada completa

D11-S17Y IgG2 (SEC ID N° 37)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYFTSRVYHWVRQAPGQGLEWMGWIYP
VTGDTYYNEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGAFYYW
GQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVR
KCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFN
WYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTPPMLDSGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPG

5

D11-8B8 IgG2 (SEC ID N° 38)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYFTSRVYHWVRQAPGQGLEWMGWIYP
VTGDTYYIEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGAFYYWG
QGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVR
CCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW
YVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTPPMLDSGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG

10

D11-C27G3 IgG2 (SEC ID N° 39)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSRYYHWVRQAPGQGLEWMGWIYP
VTGDTYYREPFKGRVTTTADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGYGAFYYWG
QGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERK
CCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW
YVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPG

C8-6 IgG2 (SEC ID N° 40)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYMHWRQAPGQGLEWMGRV
NPNRRGTTYNQKFEGRVMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARTNWLDY
WGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVE
RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFN
WYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPG

5

C8-H241 IgG2 (SEC ID N° 41)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYYMHWRQAPGQGLEWMGRV
NPNRRGTTYNQKFEGRVMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARANWLDY
WGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVE
RKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFN
WYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL

PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPG

10

C8-co-16 IgG2 (SEC ID N° 42)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGRV
 NPYRGSTTYNQKFEGRVMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARANILDYW
 GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
 LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVR
 KCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFN
 WYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
 PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPMLDSGDSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPG

Secuencias de ácidos nucleicos de la cadena pesada completa

D11-S17Y IgG2 HC (SEC ID N° 43)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTC
 TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAGGTATATACACTGGGTGCGACAGGCC
 CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTATCTCTGTAAGTGGTGATACTTACTAC
 AACGAGAAGTTCAAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC
 ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTAT
 GGGGCTTTTTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCCGCCTCCACCAAG
 GGCCCATCGGCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCC
 CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGC
 GCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCC
 CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAAC
 GTAGATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTC
 GAGTGCCCAACCGTGCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA
 AAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCGTGGTGGTGGAC
 GTGAGCCACGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCATGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTC
 CTCACCGTCGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
 AAAGGCTCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAA
 CCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTG
 ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
 CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
 CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG
 GGT

D11-8B8 IgG2 HC (SEC ID N° 44)

5

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTC
 TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAGGTATATACACTGGGTGCGACAGGCC
 CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTTATCCTGTAAGTGGTGATACTTACTAC
 ATCGAGAAGTTCAAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC
 ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGA'TCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTAT
 GGTGCTTTTTTCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCCGCCTCCACCAAG
 GGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCC
 CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC
 GCCCTGACCAGCGGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC
 CTCAGCAGCTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAAC
 GTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTC
 GAGTGCCCAACCGTGCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA
 AAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCGTGGTGGTGGAC
 GTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCATGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTC
 CTCACCGTCTGTGCACACGAGTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
 AAAGGCCTCCCGAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAA
 CCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTG
 ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
 CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
 CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG
 GGT

D11-C27G3 IgG2 HC (SEC ID N° 45)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTC
 TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACAAGTAGGTATATACACTGGGTGCGACAGGCC
 CCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTTATCCTGTAAGTGGTGATACTTACTAC
 AGAGAGCCTTTCAAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTAC
 ATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGCTAC
 GGAGCTTTTTTACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCCTCCGCCTCCACCAAG
 GGCCCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCC
 CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC
 GCCCTGACCAGCGGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC
 CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAAC
 GTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTC
 GAGTGCCCAACCGTGCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCA
 AAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCGTGGTGGTGGAC
 GTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCATGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTC
 CTCACCGTCTGTGCACACGAGTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
 AAAGGCCTCCCGAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAA
 CCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCTG
 ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
 CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
 CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG
 GGT

5

C8-6 IgG4 HC (SEC ID N° 46)

CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGTGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGTGCCTCAGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTTACCGACTACTACATGCACTGGGTGCGTCAGGCC
CCTGGTCAAGGTCTTGAGTGGATGGGTGCTGTTAATCCTAACCAGGGGTGGTACTACCTAC
AACCAGAAATTTCGAGGGCCGTGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGCGTAGCCTGCGTTCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGCGTACGAAC
TGGCTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTCAACCGTCTCCTCCGCTCCACCAAGGGC
CCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTG
GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCC
CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTA
GATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCA
TGCCCCACCCTGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCA
AAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTCGCTGGTGGTGGAC
GTGAGCCAGGAAGACCCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGGTC
CTCACCGTCTGTCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
AAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAG
CCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTG
GGT

C8-H241 IgG4 HC (SEC ID N° 47)

CAGGTTTCAGCTGGTGCAGTCTGGTGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGTGCCTCAGTGAAGGTC
TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACATTCACTGACTACTACATGCACTGGGTGCGTCAGGCC
CCTGGTCAAGGTCTTGAGTGGATGGGTGCTGTTAATCCTAACCAGGAGGGGTACTACCTAC
AACCAGAAATTTCGAGGGCCGTGTCACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTAC
ATGGAGCTGCGTAGCCTGCGTTCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGCGTACGAAC
TGGCTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTCAACCGTCTCCTCCGCTCCACCAAGGGC
CCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTG
GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCC
CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTA
GATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCA
TGCCCCACCCTGCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCA
AAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTCGCTGGTGGTGGAC
GTGAGCCAGGAAGACCCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGGTC
CTCACCGTCTGTCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
AAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAG
CCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTG
GGT

5

C8-co16 IgG4 HC (SEC ID N° 48)

CAGGTTCAAGCTGGTGCAGTCTGGTGTGAGGTGAAGAAGCCTGGTGCCTCAGTGAAGGTC
 TCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACATTCACTGACTACTACATGCACTGGGTGCGTCAGGCC
 CCTGGTCAAGGTCTTGAGTGGATGGGTGCGTGTAAATCCTTATCGGGGTAGTACTACCTAC
 AACCAGAAATTCGAGGGCCGTGTACCATGACCACAGACACATCCACGAGCACAGCCTAC
 ATGGAGCTGCGTAGCCTGCGTTCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGCGTGCGAAC
 ATTCTTGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTCACCGTCTCCTCCGCTCCACCAAGGGC
 CCATCGGTCTTCCCGCTAGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTG
 GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCC
 CTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC
 AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTA
 GATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCA
 TGCCACCCTGCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCTGTCCCCCA
 AAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGAC
 GTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCTC
 CTCACCGTCTGCACACGAGTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC
 AAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAG
 CCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTG
 ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAGCAATGGG
 CAGCCGGAGAACAATAAGACACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
 CTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGC
 TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTG
 GGT

DEC de c-Met humano–Fc–Flis (SEC ID N° 72)

MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQN
VILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFPQCDCSSKANLSG
GVWKDNINMALVVDITYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPNHNTADIQSEVHCIFS
PQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNINSSYFPDHPLHSISVRRLK
ETKDGFMFLTDQSYIDVLPFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDATFHT
RIIRFCSINSLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAVVSKEPGAQLARQI
GASLNDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPKYVNDFFNKIVNKNNVRLQ
HFYGNHEHCFNRTLNRSSGCEARRDEYRTEFTALQRVDLFMGQFSEVLLTSI
STFIKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRSRGPSTPHVNFLLDShpVSPEVIVEHTLNQ
NGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEELCS
GTWTQQICLPAIYKVPNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNE
SCTLTLSSESTMTLKCTVGPAMNKHFNMSIIISNGHGTQYSTFSYVDPVITSISPK
YGPMAGGTLLTLTGNYLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEFA
VKLKIDLANRETSIFSREDPIVYEIHPTKSFSISGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINV
HEAGRNTVACQHRNSSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIY
VHNPVFKPFEPVMISMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGKSCENIHLHSE
AVLCTVPNDLLKLNSELNIEWKQAISSVTLGKVIVQPDQNFLEVLFGQPDIEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQEYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHY
TQKSLSLSPGKR***LDYKDDDDKHVVHHHHH***

Los aminoácidos en negrita y cursiva representan la secuencia señal; los aminoácidos subrayados en negrita representan el marcador Flis.

DEC de c-Met de mono cynomolgus–Fc–Flis (SEC ID N° 73)

MKAPAVLVPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETAIQN
 VILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFCQDCSSKANLSG
 GVWKDNINMALVVDITYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPNHNTADIQSEVHCIFS
 PQIEEPNQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPHHPLHSISVRRLK
 ETKDGMFLTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYIHAFESNNFIYFLTVQRETLNAQTFHTR
 IIRFCSLNSGLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSKPGAQLARQI
 GASLNDLILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPKYVNDFFNKIVNKNNVRLQ
 HFYGPNEHCFNRLLRNSSGCEARRDEYRAEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSI
 STFVKGDLTIANLGTSEGRFMQVVVSRGPSTPHVNFLLDSHPVSPEVIVEHPLNQ
 NGYTLVVTGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECPS
 GTWTQQICLPAIYKVFPPTSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNE
 SCTLTLSESTMNTLTKCTVGPAMNKHFNMSIISNGHGTTQYSTFSYVDPHITSIPK
 YGPMAGGTLLTLTGNYLNSGNSRHSISGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISETFA
 VKLKIDLANRETSIFSREDPIVYEIHPTKSFISGGSTITGVGKNLHVSVPVMVINV
 HEAGRNFVACQHRNSSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIY
 VHNPFVKPFKPVMMISMGNEENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGKNKSCENIHLHSE
 AVLCTVPNDLLKLNSLNIWKQAISSTVLGKVIVQPDQNFTEVLFFQGPDIKPS
 CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQEYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMSHEALHNHY
 TQKSLSLSPGKRIDYKDDDDKHVHHHHHH

5

Los aminoácidos en negrita y cursiva representan la secuencia señal; los aminoácidos subrayados en negrita representan el marcador Flis.

DEC de c-Met de rata–Fc–Flis (SEC ID N° 74)

MKAPTALAPGILLLLLTLAQRSHGECKEALVKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIHN
VVLHGHHIYLGATNYIYVLNDKDLQKVSEFKTGPVVEHPDCFCQDCSSKANVS
GGVWKDNVNMALLVDITYDDQLISCGSVNRGTCQRHVLPPDNAADIQSEVHC
MFSPLAEEESGQCPDCVVSALGAKVLLSEKDRFINFFVGNTINSSYPDYSLSHSISV
RRLKETQDGFKFLTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYIHAFESNHFIYFLTVQKETLDAQT
FHTRIIRFCSVDSGLHSYMEMPLECILTEKRRKRSTREEVFNILQAAYVSKPGANL
AKQIGASPYDDILYGVFAQSKPDSAEPMNRSACAFPIKYVNDFFNKIVNKNNVNR
CLQHFYGPNEHCNRTLLRNSSGCEVRSDEYRTEFTTALQRVDLFMGRNLNHL
LTSISTFIKGLTIANLGTSEGRFMQVLSRTAHFTPHVNFLLDSYPVSPEVIVEHP
SNQNGYTLVVTGKKITKJPLNGLGCGHFQSCSQCLSAPYFIQCGWCHNRCVHSNE
CPSGTWTQEICLPAVYKVFPSTAPLEGGMTLTICGWDFGFKNNKFDLRKTKVLL
GNESCTLTLESTTNTLKCTVGPAMSEHFNVSIVSNSRETTQYSAFSYVDPVITSI
SPRYGPHAGGTLTLTGKYLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVDLSILECYTPGHTVSA
EFPVKLKIDLADRVTSFSYREDPVVSEIHPTKSFISGGSTITGIGKNLNSVSTPKLV
IEVHDVGVNYTVACQHRSSSEHCCTTPSLQQLDLQLPLKTKAFFLLDGILSKHFDL
TYVHDPMPFKPFKPMISMGNENVVEIKGDDIDPEAVKGEVLKVGNKSCENLH
WHSEALLCTVPSDLLKLNGGELNIEWKQAVSSTVLGKVIVQPDQNFALVLFQG
PDIEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQEYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGKR***IDYKDDDDKHVHHHHHH***

5 Los aminoácidos en negrita y cursiva representan la secuencia señal; los aminoácidos subrayados en negrita representan el marcador Flis.

DEC de c-Met humano (SEC ID N° 75)

MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQN
VILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFCQDCSSKANLSG
GVWKDNINMALVVDITYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPNHNTADIQSEVHCIFS
PQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNINSSYFPDHLHSISVRLK
ETKDGFMFLTDQSYIDVLPFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDATFHT
RIIRFCSINSGLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNLQAAYVSKPGAQLARQI
GASLNDLILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPKYVNDFFNKIVNKNVRLCQ
HFYGPNEHCFNRITLLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSI
STFIKGLDTIANLGTSEGRFMQVVVSRSRGPSTPHVNFLDLSHPVSPEVIVEHTLNQ
NGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECLS
GTWTQQICLPAIYKVFNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNE
SCTLTSESTMNTLKCTVGPAMNKHFNMSIISNGHGTQYSTFSYVDPVITSISPK
YGPMAGGTLTTLTGNYLNSGNSRHSISGGKTCTLSVSNISILECYTPAQTISTEFA
VKLKIDLANRETSIFSREDPIVYIEHPTKSFISGGSTITGVGKNLNSVSVPRMVINV
HEAGRNFVACQHRNSSEIJCCTTPSLQQLNLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIY
VHNPVFKPFEPVMISMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGNGKSCENIHLHSE
AVLCTVPNDLLKLNSSELNIEWKQAISSTVLGKVIVQPDQNET

Los aminoácidos en negrita y cursiva representan la secuencia señal.

Dominio Sema de c-Met humano con marcador Flis (SEC ID N° 76)

MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAETPIQN
VILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVLEHPDCFCQDCSSKANLSG
GVWKDNINMALVVDITYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPNHNTADIQSEVHCIFS
PQIEEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNINSSYFPDHLHSISVRLK
ETKDGFMFLTDQSYIDVLPFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLDATFHT
RIIRFCSINSGLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFNLQAAYVSKPGAQLARQI
GASLNDLILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPKYVNDFFNKIVNKNVRLCQ
HFYGPNEHCFNRITLLRNSSGCEARRDEYRTEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSI
STFIKGLDTIANLGTSEGRFMQVVVSRSRGPSTPHVNFLDLSHPVSPEVIVEHTLNQ
NGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSEECLS
*GTWTQQICL****DYKDDDDKHVHHHHHH***

5

Los aminoácidos en negrita y cursiva representan la secuencia señal; los aminoácidos subrayados en negrita representan el marcador Flis.

Epítomos del anticuerpo C8 en el dominio extracelular de c-Met humano

- 10 ¹²¹VVDITYDDQL₁₃₀ (SEC ID N° 77)
¹³¹ISCGSVNRGTCQRHVFPNHNTADIQS₁₅₆ (SEC ID N° 78)
¹⁷⁹ALGAKVLSSVKDRFTNF₁₉₅ (SEC ID N° 79)
²¹⁶VRLKETKDGFM₂₂₇ (SEC ID N° 80)
¹²³DTYYDD₁₂₈ (SEC ID N° 81)
15 ¹⁴⁴HVFPNHNTADIQS₁₅₆ (SEC ID N° 82)
¹⁹²FINF₁₉₅ (SEC ID N° 83)
²²⁰KETKDGFM₂₂₇ (SEC ID N° 84)

Epítomos del anticuerpo D11 en el dominio extracelular de c-Met humano

⁸⁴YKTGPVLEHPDCFPQCDCSSKANL⁹⁵ (SEC ID N° 85)

⁹⁵CFPCQDCSSKA¹⁰⁵ (SEC ID N° 86)

5 Secuencias consenso de CDR

CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo D11

GTSX₁LX₂S (SEC ID N° 87), en el que X₁ es Y o R; y X₂ es A o R;

CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo C8

SVSSSVX₃SIYLH (SEC ID N° 88), en el que X₃ es S o R;

10 CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo C8

X₄X₅YX₆GYPLT (SEC ID N° 89), en el que X₄ es I o Q, X₅ es Q o V, y X₆ es S o R;

CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo D11

WIYPVTGDTYYX₇EX₈FKG (SEC ID N° 90), en la que X₇ es N, 1, o R, y X₈ es K o P;

CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo D11

15 GYGAFX₉Y (SEC ID N° 91), en la que X₉ es Y o F;

CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo C8

RVNPX₁₀RX₁₁X₁₂TTYNQKFEG (SEC ID N° 92), en la que X₁₀ es N o Y, X₁₁ es G o R, y X₁₂ es G o S;

CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo C8

X₁₃NX₁₄LDY (SEC ID N° 93), en la que X₁₃ es T o A, y X₁₄ es W o I;

20 Secuencias consenso de la región variable de la cadena ligera

D11– Secuencia consenso de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo (SEC ID N° 94)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCSVSSSISSTNLHWYQQKPGQAPRLLIY

GTSX₁LX₂SGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPYSFG

QGTKLEIK

25 en la que X₁ es Y o R, y X₂ es A o R;

C8– Secuencia consenso de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo (SEC ID N° 95)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSVSSSVX₃SIYLHWYQQKPGKAPKLLIY

STSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCX₄X₅YX₆GYPLTFG

GGTKVEIK

en la que X₃ es S o R, X₄ es I o Q, X₅ es Q, o V, y X₆ es S o R;

30

Secuencias consenso de la región variable de la cadena pesada

D11– Secuencia consenso de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo (SEC ID N° 96)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSRYYHWVRQAPGQGLEWMGW
IYPVTGDTYYX₇EX₈FKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGY
GAFX₉YWGQGTLLTVS

en la que X₇ es N, I, o R, X₈ es K o P, y X₉ es Y o F;

5 **C8– Secuencia consenso de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo (SEC ID N° 97)**

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYMHWRQAPGQGLEWMGR
VNPX₁₀RX₁₁X₁₂TTYNQKFEGRVMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARX₁₃
NX₁₄LDYWGQGTTTVTS

en la que X₁₀ es Y o N, X₁₁ es G o R, X₁₂ es S o G, X₁₃ es A o T, y X₁₄ es I o W.

10 **Listado de secuencias**

<110> Eli Lilly and Company

<120> Anticuerpos de c-Met

15 <130> X-18217

<150> 61/116825 <151> 2008-11-21

<150> 61/219903 <151> 2009-06-24

20

<160> 97

<170> PatentIn versión 3,5

25 <210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 1

```

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Thr
20           25           30

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

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

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

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

Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100          105

```

- 5 <210> 2
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 2

ES 2 549 760 T3

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

<210> 3

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 3

ES 2 549 760 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Thr
 20 25 30

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

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

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

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

Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 4

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 4

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Val Ser Ser Ile
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10 <400> 5

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Val Ser Ser Ile
          20           25           30

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

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

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

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

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

```

15 <210> 6

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 6

ES 2 549 760 T3

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

<210> 7

<211> 324

5 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 7

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gtgtcagctc aagtataagt tccaccaact tacactggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggcacatcct atctggcttc tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcaa cagtggagta gttaccogta cagtttcggc 300
 caagggacca agttggagat caaa 324

15

<210> 8

<211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 8

5

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gtgtcagctc aagtataagt tccaccaact tacactggta ccagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggcacatcct acctggcttc tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcaa cagtggagta gttaccgta cagtttcggc	300
caagggacca agttggagat caaa	324

<210> 9

<211> 324

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<400> 9

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gtgtcagctc aagtataagt tccaccaact tacactggta ccagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggcacatcca gactgagatc tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcaa cagtggagta gttaccgta cagtttcggc	300
caagggacca agttggagat caaa	324

20

<210> 10

<211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 10

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgca gtgtcagctc aagtgttaagt tccatttact tgcactggta tcagcagaaa      120
    ccagggaaag cccctaagct cctgatctat agcacatcca acttggtctc tggagtccca      180
    tcaagggttca gtggcagtgg atctgggaca gatttcactc tcaccatcag cagtctgcaa      240
    cctgaagatt ttgcaactta ctactgtatt cagtacagtg gttacccgct cacgttcggc      300
    ggagggacca aggtggagat caaaa                                     324

```

5

<210> 11

<211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 11

15

```

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgca gtgtcagctc aagtgttaagt tccatttact tgcactggta tcagcagaaa      120
    ccagggaaag cccctaagct cctgatctat agcacatcca acttggtctc tggagtccca      180
    tcaagggttca gtggcagtgg atctgggaca gatttcactc tcaccatcag cagtctgcaa      240
    cctgaagatt ttgcaactta ctactgtcag gtgtacagtg gttacccgct cacgttcggc      300
    ggagggacca aggtggagat caaaa                                     324

```

<210> 12

<211> 324

20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<400> 12

ES 2 549 760 T3

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgca gtgtcagctc aagtgtacgt tccatttact tgcactggta tcagcagaaa      120
ccagggaaag cccctaagct cctgatctat agcacatcca acttggcttc tggagtccca      180
tcaagggttca gtggcagtggt atctgggaca gatttcactc tcaccatcag cagtctgcaa      240
cctgaagatt ttgcaactta ctactgtcag gtgtacaggg gttacccgct cacgttcggc      300
ggagggacca aggtggagat caaaa                                           324

```

<210> 13

<211> 115

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 13

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1          5          10          15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Arg
          20          25          30

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Val Thr Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50          55          60

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

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

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

Thr Val Ser
          115

```

15

<210> 14

<211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 14

5

```

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser
          115

```

<210> 15

10 <211> 115

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<400> 15

ES 2 549 760 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Val Thr Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Glu Pro Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser
115

<210> 16

<211> 114

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 16

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

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

ES 2 549 760 T3

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

<210> 17

<211> 114

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 17

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

<210> 18

<211> 114

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 18

10

```

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ala Asn Ile Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
          100          105          110

Val Ser
    
```

<210> 19

<211> 345

15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

20

<400> 19

ES 2 549 760 T3

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc	60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca agtaggtata tacactgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atttatcctg taactggtga tacttactac	180
aacgagaagt tcaagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggctac	300
ggagcttttt actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcc	345

<210> 20

<211> 345

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 20

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc	60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca agtaggtata tacactgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atttatcctg taactggtga tacttactac	180
atcgagaagt tcaagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggctat	300
ggtgcttttt tctactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcc	345

15 <210> 21

<211> 345

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 21

ES 2 549 760 T3

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca agtaggtata tacactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atttatcctg taactggtga tacttactac 180
 agagagcctt tcaagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggctat 300
 ggggcttttt actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcc 345

<210> 22

<211> 342

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 22

caggttcagc tgggtgcagtc tgggtgctgag gtgaagaagc ctgggtgcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc gactactaca tgcactgggt gcgtcaggcc 120
 cctgggtcaag gtcttgagtg gatgggtcgt gttaatccta accggggtgg tactacctac 180
 aaccagaaat tcgagggccg tgtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
 atggagctgc gtagcctgcg ttctgacgac acggccgtgt attactgtgc gcgtacgaac 300
 tggcttgact actggggcca gggcaccacc gtcaccgtct cc 342

15

<210> 23

<211> 342

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 23

25

ES 2 549 760 T3

```

cagggttcagc tgggtgcagtc tgggtgctgag gtgaagaagc ctggtgcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc gactactaca tgcactgggt gcgtcaggcc      120
cctgggtcaag gtcttgagtg gatgggtcgt gttaatccta accggagggg tactacctac      180
aaccagaaat tcgagggccg tgtcaccatg accacagaca catccaagag cacagcctac      240
atggagctgc gtagcctgcg ttctgacgac acggccgtgt attactgtgc gcgtgcgaac      300
tggtttgact actggggcca gggcaccacc gtcaccgtct cc                          342

```

<210> 24

<211> 342

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 24

```

cagggttcagc tgggtgcagtc tgggtgctgag gtgaagaagc ctggtgcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctgggta cacattcact gactactaca tgcactgggt gcgtcaggcc      120
cctgggtcaag gtcttgagtg gatgggtcgt gttaatcctt atcggggtag tactacctac      180
aaccagaaat tcgagggccg tgtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac      240
atggagctgc gtagcctgcg ttctgacgac acggccgtgt attactgtgc gcgtgcgaac      300
attcttgact actggggcca gggcaccacc gtcaccgtct cc                          342

```

15 <210> 25

<211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 25

ES 2 549 760 T3

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

<210> 26

5 <211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 26

ES 2 549 760 T3

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

- 5 <210> 27
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
 <223> Construcción sintética
- <400> 27

ES 2 549 760 T3

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

<210> 28

5 <211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 28

ES 2 549 760 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Val Ser Ser Ile

20 25 30

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

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

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

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

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

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 29

5 <211> 215

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 29

ES 2 549 760 T3

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

5 <210> 30
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 30

5

```

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
      115          120          125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
      130          135          140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
      145          150          155          160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
      165          170          175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
      180          185          190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
      195          200          205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210          215

```

<210> 31

<211> 645

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 31

5	gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
	ctctcctgca gtgtcagctc aagtataagt tccaccaact tacactggta ccagcagaaa	120
	cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggcacatcct acctggcttc tggcatccca	180
	gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240
	cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcaa cagtggagta gttaccogta cagtttcggc	300
	caagggacca agttggagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg	360
	ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420
	tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc	480
	caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg	540
	acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag	600
	ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgc	645

<210> 32

<211> 645

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<400> 32

ES 2 549 760 T3

gaaatttgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gtgtcagctc aagtataagt tccaccaact tacactggta ccagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggcacatcct acctggcttc tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcaact tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcaa cagtggagta gttaccgta cagtttcggc	300
caagggacca agttggagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg	360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc	480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg	540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag	600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgc	645

<210> 33

<211> 645

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 33

gaaatttgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gtgtcagctc aagtataagt tccaccaact tacactggta ccagcagaaa	120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggcacatcca gactgagatc tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcaact tcaccatcag cagactggag	240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcaa cagtggagta gttaccgta cagtttcggc	300
caagggacca agttggagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg	360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc	480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg	540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag	600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgc	645

15

<210> 34

<211> 645

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Construcción sintética

<400> 34

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgca gtgtcagctc aagtgtatcc tccatttact tgcactggta tcagcagaaa	120
ccagggaaag cccctaagct cctgatctat agcacatcca acttggcttc tggagtccca	180
tcaagggttca gtggcagtggt atctgggaca gatttcactc tcaccatcag cagtctgcaa	240
cctgaagatt ttgcaactta ctactgtatt cagtacagtg gttacccgct caggttcggc	300
ggagggacca aggtggagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttccc	360
ccatctgatg agcagttgaa atctgggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420
tatcccagag aggccaaaagt acagtgggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc	480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg	540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag	600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgc	645

10

<210> 35

<211> 645

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 35

20

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgca gtgtcagctc aagtgtatcc tccatttact tgcactggta tcagcagaaa	120
ccagggaaag cccctaagct cctgatctat agcacatcca acttggcttc tggagtccca	180

ES 2 549 760 T3

tcaaggttca gtggcagtgg atctgggaca gatttcactc tcaccatcag cagtctgcaa	240
cctgaagatt ttgcaactta ctactgtcaa gtctacagtg gttaccogct cacgttcggc	300
ggagggacca aggtggagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttccc	360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggttaactcc	480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg	540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag	600
ggcctgagct cggccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgc	645

<210> 36

<211> 645

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 36

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgca gtgtcagctc aagtgtacgt tccatttact tgcactggta tcagcagaaa	120
ccagggaaag cccctaagct cctgatctat agcacatcca acttggcttc tggagtccca	180
tcaaggttca gtggcagtgg atctgggaca gatttcactc tcaccatcag cagtctgcaa	240
cctgaagatt ttgcaactta ctactgtcag gtgtacaggg gttaccogct cacgttcggc	300
ggagggacca aggtggagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttccc	360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggttaactcc	480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg	540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag	600
ggcctgagct cggccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgc	645

15 <210> 37

<211> 441

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 37

5

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Val Thr Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
260 265 270

Tyr Val Asp Gly Met Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285

ES 2 549 760 T3

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
 290 295 300
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 305 310 315 320
 Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
 325 330 335
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 340 345 350
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 405 410 415
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440

<210> 38

<211> 441

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 38

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

ES 2 549 760 T3

50	55	60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80		
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95		
Ala Arg Gly Tyr Gly Ala Phe Phe Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val 100 105 110		
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala 115 120 125		
Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu 130 135 140		
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly 145 150 155 160		
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser 165 170 175		
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe 180 185 190		
Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr 195 200 205		
Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro 210 215 220		
Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro 225 230 235 240		
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys 245 250 255		
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp 260 265 270		
Tyr Val Asp Gly Met Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu 275 280 285		
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val 290 295 300		
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn 305 310 315 320		

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
325 330 335

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
340 345 350

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 39

<211> 441

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 39

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Val Thr Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Glu Pro Phe
50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

ES 2 549 760 T3

85										90										95									
Ala	Arg	Gly	Tyr	Gly	Ala	Phe	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val														
			100					105						110															
Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala														
		115					120					125																	
Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu														
	130					135					140																		
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly														
145					150					155					160														
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser														
				165					170					175															
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe														
		180						185						190															
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr														
		195					200						205																
Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro														
	210					215					220																		
Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro														
225					230					235					240														
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys														
			245						250					255															
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp														
			260					265					270																
Tyr	Val	Asp	Gly	Met	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu														
		275					280					285																	
Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val														
		290				295					300																		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn														
305					310					315					320														
Lys	Gly	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly														
			325						330					335															
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu														
			340					345					350																

ES 2 549 760 T3

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440

<210> 40

<211> 440

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 40

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

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

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

Gly Arg Val Asn Pro Asn Arg Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Thr Asn Trp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

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

ES 2 549 760 T3

115	120	125
Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val 130 135 140		
Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala 145 150 155 160		
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly 165 170 175		
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly 180 185 190		
Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys 195 200 205		
Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys 210 215 220		
Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys 225 230 235 240		
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val 245 250 255		
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr 260 265 270		
Val Asp Gly Met Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu 275 280 285		
Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His 290 295 300		
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys 305 310 315 320		
Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln 325 330 335		
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met 340 345 350		
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro 355 360 365		
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn 370 375 380		

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
385 390 395 400

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
405 410 415

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 41

<211> 440

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 41

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

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

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

Gly Arg Val Asn Pro Asn Arg Arg Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ala Asn Trp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala

ES 2 549 760 T3

145		150		155		160
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly	165		170		175	
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly	180		185		190	
Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys	195		200		205	
Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys	210		215		220	
Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys	225		230		235	240
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val	245		250		255	
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr	260		265		270	
Val Asp Gly Met Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu	275		280		285	
Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His	290		295		300	
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys	305		310		315	320
Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln	325		330		335	
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met	340		345		350	
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro	355		360		365	
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn	370		375		380	
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu	385		390		395	400
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val	405		410		415	
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln	420		425		430	
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly	435		440			

<210> 42

5 <211> 440

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Construcción sintética

<400> 42

```

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ala Asn Ile Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
          100          105          110

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
          115          120          125

Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
          130          135          140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145          150          155          160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
          165          170          175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly

```

ES 2 549 760 T3

180	185	190
Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys 195 200 205		
Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys 210 215 220		
Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys 225 230 235 240		
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val 245 250 255		
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr 260 265 270		
Val Asp Gly Met Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu 275 280 285		
Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His 290 295 300		
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys 305 310 315 320		
Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln 325 330 335		
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met 340 345 350		
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro 355 360 365		
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn 370 375 380		
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu 385 390 395 400		
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val 405 410 415		
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln 420 425 430		
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly 435 440		

<210> 43

<211> 1323

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 43

5

```

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctggeta caccttcaca agtaggtata tacactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atttatcctg taactggtga tacttactac      180
aacgagaagt tcaagggcag agtcacgatt accgcgagaca aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggctat      300
ggggcttttt actactgggg ccagggcacc ctggtcaccg tctcctccgc ctccaccaag      360
ggcccatcgg tcttcccgct agcgcctcgc tccaggagca cctccgagag cacagccgcc      420
ctgggtgccc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgctgt gaactcaggc      480
gccctgacca ggggctgtga caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc      540
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc aacttcggca ccagaccta cacctgcaac      600
gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc      660
gagtgcaccac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctt cttcccccca      720
aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac      780
gtgagccacg aagaccccgga ggtccagtto aactggtagc tggacggcat ggaggtgcat      840
aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc      900
ctcacgtcg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac      960
aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaaac atctccaaa ocaaagggca gccccgagaa     1020
ccacagggtg acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg     1080
acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg     1140
cagcgggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctctttcttc     1200
ctctacagca agctcacctg ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc     1260
tcctgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctccg     1320
ggt                                             1323

```

<210> 44

<211> 1323

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<400> 44

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca agtaggtata tacactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atttactctg taactggtga tacttactac 180
 atcgagaagt tcaagggcag agtcacgatt accgcggaaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggctat 300
 ggtgcttttt tctactgggg ccagggcacc ctggtcaccc tctcctccgc ctccaccaag 360
 ggcccatcgg tcttcccgt agcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagccgcc 420
 ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgcgtg gaactcaggc 480
 gccctgacca gggcgctgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 540
 ctgagcagcg tgggtgaccgt gccctccagc aacttcggca cccagaccta cacctgcaac 600
 gtagatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc 660
 gagtgcaccac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctt cttcccccca 720
 aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 780
 gtgagccacg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggacggcat ggaggtgcat 840
 aatgccaaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 900
 ctacccgtcg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 960
 aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa 1020
 ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1080
 acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1140
 cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctcccttctc 1200
 ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1260
 tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctccg 1320
 ggt 1323

<210> 45

5 <211> 1323

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 45

ES 2 549 760 T3

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcttgcaagg cttctggcta caccttcaca agtaggtata tacactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atttatcctg taactggtga tacttactac 180
agagagcctt tcaagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggctac 300
ggagcttttt actactgggg ccagggcacc ctgggtcaccg tctcctccgc ctccaccaag 360
ggcccatcgg tcttcccgct agcgcctgc tccaggagca cctccgagag cacagccgcc 420
ctgggtgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgcgtg gaactcaggc 480
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 540
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc aacttcggca cccagaccta cacctgcaac 600
gtagatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc 660
gagtgccac cgtgcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctt cttcccccca 720
aaacccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 780
gtgagccacg aagacccga ggtccagttc aactggtacg tggacggcat ggaggtgcat 840
aatgccaa ga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc 900
ctcacgctcg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 960
aaaggcctcc cagccccat cgagaaaacc atctccaaa ccaaaggga gccccgagaa 1020
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1080
acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg 1140
cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctcttcttc 1200
ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc 1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctccg 1320
ggt 1323

<210> 46

5 <211> 1323

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 46

ES 2 549 760 T3

```

caggttcagc tgggtgcagtc tgggtgctgag gtgaagaagc ctggtgcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctgggta cacctttacc gactactaca tgcactgggt gcgtcaggcc      120
cctggccaag gtcttgagtg gatgggtcgt gttaatccta accggggtgg tactacctac      180
aaccagaaat tcgagggccg tgtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac      240
atggagctgc gtagcctgcg ttctgacgac acggccgtgt attactgtgc gcgtacgaac      300
tggcttgact actggggcca gggcaccacc gtcaccgtct cctccgcctc caccaagggc      360
ccatcggtct tcccgtagc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agccgcctg      420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgcgtggaa ctcaggcgcc      480
ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggt gtcctacagt cctcaggact ctactccctc      540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta      600
gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg agtccaaata tggccccca      660
tgcccaccct gccagcacc tgaggccgcc gggggaccat cagtcttcct gttccccca      720
aaaccgaagg acactctcat gatctcccg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac      780
gtgagccagg aagacccga ggtccagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat      840
aatgccaaaga caaagcccg ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc      900
ctcacgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac      960
aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagag      1020
ccacaggtgt acaccctgcc cccatoccag gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg      1080
acctgcctgg tcaaaggctt ctaccocagc gacatcgccg tggagtggga aagcaatggg      1140
cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc      1200
ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg aggggaatgt cttctcatgc      1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctctg      1320
ggt

```

<210> 47

5 <211> 1323

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 47

ES 2 549 760 T3

```

caggttcagc tgggtgcagtc tgggtgctgag gtgaagaagc ctggtgcctc agtgaaggtc      60
tcttgcaagg cttctgggta cacattcact gactactaca tgcactgggt gcgtcaggcc      120
cctggccaag gtcttgagtg gatgggtcgt gttaatccta accggagggg tactacctac      180
aaccagaaat tcgagggccg tgtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac      240
atggagctgc gtagcctgcg ttctgacgac acggccgtgt attactgtgc gcgtgcgaac      300
tggcttgact actggggcca gggcaccacc gtcaccgtct cctccgcctc caccaagggc      360
ccatcggtct tcccgttagc gccctgctcc aggagcaoct ccgagagcac agccgccctg      420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc      480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc      540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta      600
gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg agtccaaata tgggtcccca      660
tgcccaccct gccagcacc tgaggccgcc gggggaccat cagtcttctt gttcccccca      720
aaacccaagg acactctcat gatctcccgg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac      780
gtgagccagg aagaccccga ggtccagtcc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat      840
aatgccaaga caaagccgog ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc      900
ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac      960
aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagag      1020
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccag gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg      1080
acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga aagcaatggg      1140
cagccggaga acaactacaa gaccacgctt cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc      1200
ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg aggggaatgt cttctcatgc      1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctctg      1320
ggt                                         1323

```

<210> 48

5 <211> 1323

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 48

cagggttcagc tgggtgcagtc tgggtgctgag gtgaagaagc ctggtgcctc agtgaaggtc 60
tctctgcaagg cttctgggta cacattcact gactactaca tgcactgggt gcgtcaggcc 120
cctgggtcaag gtcttgagtg gatgggtcgt gttaatcctt atcggggtag tactacctac 180
aaccagaaat tcgagggccg tgtcaccatg accacagaca catccacgag cacagcctac 240
atggagctgc gtagcctgcg ttctgacgac acggccgtgt attactgtgc gcgtgcgaac 300
attcttgact actggggcca gggcaccacc gtcaccgtct cctccgcctc caccaagggc 360
ccatcggtct tcccgtagc gccctgctcc aggagcacct ccgagagcac agccgccctg 420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcacga agacctacac ctgcaacgta 600
gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg agtccaaata tgggtcccca 660
tgcccaccct gccagcacc tgaggccgcc gggggaccat cagtcttcct gttccccca 720
aaacccaagg acactctcat gatctcccg accctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 780
gtgagccagg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggatggcgt ggaggtgcat 840
aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag ttcaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc 900
ctcacgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac 960
aaaggcctcc cgtcctccat cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gccccgagag 1020
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccag gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg 1080
acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga aagcaatggg 1140
cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg actccgacgg ctcccttcttc 1200
ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg aggggaatgt cttctcatgc 1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctctg 1320
ggt 1323

<210> 49

5 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 49

Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Thr Asn Leu His
1 5 10

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 50

10

Gly Thr Ser Tyr Leu Ala Ser
1 5

<210> 51

<211> 9

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

20

<400> 51

Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Ser
1 5

25

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 52

35

Gly Thr Ser Arg Leu Arg Ser
1 5

<210> 53
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Construcción sintética

 10 <400> 53

 Ser Val Ser Ser Ser Val Ser Ser Ile Tyr Leu His
 1 5 10

 <210> 54
 15 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Construcción sintética

 <400> 54

 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 25
 <210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Construcción sintética

 <400> 55
 35

Ile Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 56

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 56

Gln Val Tyr Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
1 5

15 <210> 57

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 57

25 Ser Val Ser Ser Ser Val Arg Ser Ile Tyr Leu His
1 5 10

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

35 <400> 58

ES 2 549 760 T3

Gln Val Tyr Arg Gly Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 59

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 59

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Arg Tyr Ile His
1 5 10

15 <210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 60

Trp Ile Tyr Pro Val Thr Gly Asp Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

25 Gly

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 61

Gly Tyr Gly Ala Phe Tyr Tyr
1 5

5 <210> 62

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 62

Trp Ile Tyr Pro Val Thr Gly Asp Thr Tyr Tyr Ile Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

15 Gly

<210> 63

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25 <400> 63

Gly Tyr Gly Ala Phe Phe Tyr
1 5

<210> 64

30 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 64

5

Trp Ile Tyr Pro Val Thr Gly Asp Thr Tyr Tyr Arg Glu Pro Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 65

<211> 10

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<400> 65

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met His

1

5

10

20

<210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 66

30

Arg Val Asn Pro Asn Arg Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 67

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 67

Thr Asn Trp Leu Asp Tyr
1 5

15 <210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Construcción sintética

<400> 68

Arg Val Asn Pro Asn Arg Arg Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
1 5 10 15

25 Gly

<210> 69

<211> 6

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 69

5

Ala Asn Trp Leu Asp Tyr
1 5

<210> 70

<211> 17

<212> PRT

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15

<400> 70

Arg Val Asn Pro Tyr Arg Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 71

20

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25

<223> Construcción sintética

<400> 71

Ala Asn Ile Leu Asp Tyr
1 5

30

<210> 72

<211> 1192

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

```

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe
1          5          10          15

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

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
35          40          45

Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu
50          55          60

Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys
65          70          75          80

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe
85          90          95

```

5

ES 2 549 760 T3

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp
 100 105 110
 Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
 115 120 125
 Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
 130 135 140
 Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
 145 150 155 160
 Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val
 165 170 175
 Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe
 180 185 190
 Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
 195 200 205
 His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
 210 215 220
 Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
 225 230 235 240
 Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn
 245 250 255
 Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln
 260 265 270
 Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
 275 280 285
 His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
 290 295 300
 Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
 305 310 315 320
 Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
 325 330 335
 Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
 340 345 350
 Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys

ES 2 549 760 T3

355	360	365
Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg 370 375 380		
Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg 385 390 395 400		
Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr 405 410 415		
Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly 420 425 430		
Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly 435 440 445		
Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln 450 455 460		
Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu 465 470 475 480		
Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu 485 490 495		
Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys 500 505 510		
Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln 515 520 525		
Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys 530 535 540		
Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile 545 550 555 560		
Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu 565 570 575		
Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg 580 585 590		
Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu 595 600 605		
Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys 610 615 620		

ES 2 549 760 T3

Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile
 625 630 635 640
 Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp
 645 650 655
 Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly
 660 665 670
 Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg
 675 680 685
 His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn
 690 695 700
 Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe
 705 710 715 720
 Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe
 725 730 735
 Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser
 740 745 750
 Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn
 755 760 765
 Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg
 770 775 780
 Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys
 785 790 795 800
 Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys
 805 810 815
 Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp
 820 825 830
 Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val
 835 840 845
 Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp
 850 855 860
 Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys
 865 870 875 880

ES 2 549 760 T3

Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val
 885 890 895
 Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys
 900 905 910
 Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp
 915 920 925
 Gln Asn Phe Thr Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Asp Ile Glu Pro
 930 935 940
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 945 950 955 960
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 965 970 975
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 980 985 990
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 995 1000 1005
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 1010 1015 1020
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 1025 1030 1035
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 1040 1045 1050
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 1055 1060 1065
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Glu Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 1070 1075 1080
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 1085 1090 1095
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 1100 1105 1110
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 1115 1120 1125

ES 2 549 760 T3

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 1130 1135 1140
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 1145 1150 1155
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1160 1165 1170
 Lys Arg Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys His Val His His
 1175 1180 1185
 His His His His
 1190

<210> 73

<211> 1192

<212> PRT

5 <213> Macao mulatta

<400> 73

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

ES 2 549 760 T3

Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Asn Gln Cys Pro Asp Cys Val
165 170 175

Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe
180 185 190

Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro His
195 200 205

His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
210 215 220

Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
225 230 235 240

Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Ile His Ala Phe Glu Ser Asn
245 250 255

Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asn Ala Gln
260 265 270

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Leu Asn Ser Gly Leu
275 280 285

His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
290 295 300

Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
305 310 315 320

Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
325 330 335

Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
340 345 350

Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
355 360 365

Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
370 375 380

Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg
385 390 395 400

Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr
405 410 415

ES 2 549 760 T3

Arg Ala Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly
420 425 430

Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Val Lys Gly
435 440 445

Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln
450 455 460

Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu
465 470 475 480

Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Pro Leu
485 490 495

Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Val Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys
500 505 510

Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln
515 520 525

Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys
530 535 540

Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Pro Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile
545 550 555 560

Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Thr Ser Ala Pro Leu Glu
565 570 575

Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg
580 585 590

Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu
595 600 605

Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys
610 615 620

Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile
625 630 635 640

Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp
645 650 655

Pro Ile Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly
660 665 670

ES 2 549 760 T3

Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg
 675 680 685
 His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn
 690 695 700
 Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe
 705 710 715 720
 Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe
 725 730 735
 Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser
 740 745 750
 Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu His
 755 760 765
 Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg
 770 775 780
 Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys
 785 790 795 800
 Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys
 805 810 815
 Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp
 820 825 830
 Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val
 835 840 845
 Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp
 850 855 860
 Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys
 865 870 875 880
 Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val
 885 890 895
 Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys
 900 905 910
 Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp
 915 920 925
 Gln Asn Phe Thr Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Asp Ile Glu Pro

ES 2 549 760 T3

930		935		940
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu				
945		950		955 960
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp				
	965		970	975
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp				
	980		985	990
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly				
	995		1000	1005
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr				
	1010		1015	1020
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln				
	1025		1030	1035
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys				
	1040		1045	1050
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly				
	1055		1060	1065
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Glu Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu				
	1070		1075	1080
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly				
	1085		1090	1095
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln				
	1100		1105	1110
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp				
	1115		1120	1125
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg				
	1130		1135	1140
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala				
	1145		1150	1155
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly				
	1160		1165	1170
Lys Arg Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys His Val His His				
	1175		1180	1185
His His His His				
	1190			

<210> 74

5 <211> 1194

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 74

```

Met Lys Ala Pro Thr Ala Leu Ala Pro Gly Ile Leu Leu Leu Leu Leu
 1              5              10              15

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

Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala
      35              40              45

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

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

Val Ser Glu Phe Lys Thr Gly Pro Val Val Glu His Pro Asp Cys Phe
      85              90              95

Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Val Ser Gly Gly Val Trp
      100              105              110

Lys Asp Asn Val Asn Met Ala Leu Leu Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
      115              120              125

Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
      130              135              140

Val Leu Pro Pro Asp Asn Ala Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
      145              150              155              160

Met Phe Ser Pro Leu Ala Glu Glu Glu Ser Gly Gln Cys Pro Asp Cys
      165              170              175

Val Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Leu Ser Glu Lys Asp Arg
      180              185              190

Phe Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Pro Pro
      195              200              205

```

Asp Tyr Ser Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Gln
 210 215 220
 Asp Gly Phe Lys Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro
 225 230 235 240
 Glu Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Ile His Ala Phe Glu Ser
 245 250 255
 Asn His Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Lys Glu Thr Leu Asp Ala
 260 265 270
 Gln Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Val Asp Ser Gly
 275 280 285
 Leu His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys
 290 295 300
 Arg Arg Lys Arg Ser Thr Arg Glu Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala
 305 310 315 320
 Ala Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Asn Leu Ala Lys Gln Ile Gly Ala
 325 330 335
 Ser Pro Tyr Asp Asp Ile Leu Tyr Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro
 340 345 350
 Asp Ser Ala Glu Pro Met Asn Arg Ser Ala Val Cys Ala Phe Pro Ile
 355 360 365
 Lys Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val
 370 375 380
 Arg Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn
 385 390 395 400
 Arg Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Val Arg Ser Asp Glu
 405 410 415
 Tyr Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met
 420 425 430
 Gly Arg Leu Asn His Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys
 435 440 445
 Gly Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met
 450 455 460
 Gln Val Val Leu Ser Arg Thr Ala His Phe Thr Pro His Val Asn Phe

ES 2 549 760 T3

465		470		475		480
Leu Leu Asp Ser Tyr Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Pro						
		485		490		495
Ser Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Val Thr Gly Lys Lys Ile Thr						
		500		505		510
Lys Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Gly His Phe Gln Ser Cys Ser						
		515		520		525
Gln Cys Leu Ser Ala Pro Tyr Phe Ile Gln Cys Gly Trp Cys His Asn						
		530		535		540
Arg Cys Val His Ser Asn Glu Cys Pro Ser Gly Thr Trp Thr Gln Glu						
		545		550		555
Ile Cys Leu Pro Ala Val Tyr Lys Val Phe Pro Thr Ser Ala Pro Leu						
		565		570		575
Glu Gly Gly Thr Met Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Lys						
		580		585		590
Lys Asn Asn Lys Phe Asp Leu Arg Lys Thr Lys Val Leu Leu Gly Asn						
		595		600		605
Glu Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Thr Asn Thr Leu Lys						
		610		615		620
Cys Thr Val Gly Pro Ala Met Ser Glu His Phe Asn Val Ser Val Ile						
		625		630		635
Val Ser Asn Ser Arg Glu Thr Thr Gln Tyr Ser Ala Phe Ser Tyr Val						
		645		650		655
Asp Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Arg Tyr Gly Pro His Ala Gly						
		660		665		670
Gly Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Lys Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser						
		675		680		685
Arg His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser						
		690		695		700
Asp Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Gly His Thr Val Ser Ala Glu						
		705		710		715
Phe Pro Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asp Arg Val Thr Ser Ser						
		725		730		735

ES 2 549 760 T3

Phe Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Val Val Ser Glu Ile His Pro Thr Lys
 740 745 750
 Ser Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Ile Gly Lys Asn Leu
 755 760 765
 Asn Ser Val Ser Thr Pro Lys Leu Val Ile Glu Val His Asp Val Gly
 770 775 780
 Val Asn Tyr Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Ser Ser Glu Ile Ile
 785 790 795 800
 Cys Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asp Leu Gln Leu Pro Leu
 805 810 815
 Lys Thr Lys Ala Phe Phe Leu Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys His Phe
 820 825 830
 Asp Leu Thr Tyr Val His Asp Pro Met Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro
 835 840 845
 Val Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Val Glu Ile Lys Gly Asp
 850 855 860
 Asp Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn
 865 870 875 880
 Lys Ser Cys Glu Asn Leu His Trp His Ser Glu Ala Leu Leu Cys Thr
 885 890 895
 Val Pro Ser Asp Leu Leu Lys Leu Asn Gly Gly Glu Leu Asn Ile Glu
 900 905 910
 Trp Lys Gln Ala Val Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln
 915 920 925
 Pro Asp Gln Asn Phe Ala Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Asp Ile
 930 935 940
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 945 950 955 960
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 965 970 975
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 980 985 990

ES 2 549 760 T3

Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
	995						1000					1005			
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
	1010					1015					1020				
Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
	1025					1030					1035				
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	
	1040					1045					1050				
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	
	1055					1060					1065				
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Glu	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	
	1070					1075					1080				
Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	
	1085					1090					1095				
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	
	1100					1105					1110				
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
	1115					1120					1125				
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	
	1130					1135					1140				
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
	1145					1150					1155				
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	
	1160					1165					1170				
Pro	Gly	Lys	Arg	Ile	Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	His	Val	
	1175					1180					1185				
His	His	His	His	His	His										
	1190														

<210> 75

<211> 932

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

10

Met Lys Ala Pro Ala Val Leu Ala Pro Gly Ile Leu Val Leu Leu Phe

ES 2 549 760 T3

1	5	10	15
Thr Leu Val Gln Arg Ser Asn Gly Glu Cys Lys Glu Ala Leu Ala Lys	20	25	30
Ser Glu Met Asn Val Asn Met Lys Tyr Gln Leu Pro Asn Phe Thr Ala	35	40	45
Glu Thr Pro Ile Gln Asn Val Ile Leu His Glu His His Ile Phe Leu	50	55	60
Gly Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Val Leu Asn Glu Glu Asp Leu Gln Lys	65	70	75
Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe	85	90	95
Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp	100	105	110
Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp	115	120	125
Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His	130	135	140
Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys	145	150	155
Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val	165	170	175
Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe	180	185	190
Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp	195	200	205
His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp	210	215	220
Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu	225	230	235
Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn	245	250	255
Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln	260	265	270

ES 2 549 760 T3

Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
 275 280 285
 His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
 290 295 300
 Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
 305 310 315 320
 Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
 325 330 335
 Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
 340 345 350
 Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
 355 360 365
 Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
 370 375 380
 Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg
 385 390 395 400
 Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr
 405 410 415
 Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly
 420 425 430
 Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly
 435 440 445
 Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln
 450 455 460
 Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu
 465 470 475 480
 Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu
 485 490 495
 Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys
 500 505 510
 Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln
 515 520 525

ES 2 549 760 T3

Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys
 530 535 540

Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile
 545 550 555 560

Cys Leu Pro Ala Ile Tyr Lys Val Phe Pro Asn Ser Ala Pro Leu Glu
 565 570 575

Gly Gly Thr Arg Leu Thr Ile Cys Gly Trp Asp Phe Gly Phe Arg Arg
 580 585 590

Asn Asn Lys Phe Asp Leu Lys Lys Thr Arg Val Leu Leu Gly Asn Glu
 595 600 605

Ser Cys Thr Leu Thr Leu Ser Glu Ser Thr Met Asn Thr Leu Lys Cys
 610 615 620

Thr Val Gly Pro Ala Met Asn Lys His Phe Asn Met Ser Ile Ile Ile
 625 630 635 640

Ser Asn Gly His Gly Thr Thr Gln Tyr Ser Thr Phe Ser Tyr Val Asp
 645 650 655

Pro Val Ile Thr Ser Ile Ser Pro Lys Tyr Gly Pro Met Ala Gly Gly
 660 665 670

Thr Leu Leu Thr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Asn Ser Gly Asn Ser Arg
 675 680 685

His Ile Ser Ile Gly Gly Lys Thr Cys Thr Leu Lys Ser Val Ser Asn
 690 695 700

Ser Ile Leu Glu Cys Tyr Thr Pro Ala Gln Thr Ile Ser Thr Glu Phe
 705 710 715 720

Ala Val Lys Leu Lys Ile Asp Leu Ala Asn Arg Glu Thr Ser Ile Phe
 725 730 735

Ser Tyr Arg Glu Asp Pro Ile Val Tyr Glu Ile His Pro Thr Lys Ser
 740 745 750

Phe Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Gly Lys Asn Leu Asn
 755 760 765

Ser Val Ser Val Pro Arg Met Val Ile Asn Val His Glu Ala Gly Arg
 770 775 780

ES 2 549 760 T3

Asn Phe Thr Val Ala Cys Gln His Arg Ser Asn Ser Glu Ile Ile Cys
 785 790 795 800
 Cys Thr Thr Pro Ser Leu Gln Gln Leu Asn Leu Gln Leu Pro Leu Lys
 805 810 815
 Thr Lys Ala Phe Phe Met Leu Asp Gly Ile Leu Ser Lys Tyr Phe Asp
 820 825 830
 Leu Ile Tyr Val His Asn Pro Val Phe Lys Pro Phe Glu Lys Pro Val
 835 840 845
 Met Ile Ser Met Gly Asn Glu Asn Val Leu Glu Ile Lys Gly Asn Asp
 850 855 860
 Ile Asp Pro Glu Ala Val Lys Gly Glu Val Leu Lys Val Gly Asn Lys
 865 870 875 880
 Ser Cys Glu Asn Ile His Leu His Ser Glu Ala Val Leu Cys Thr Val
 885 890 895
 Pro Asn Asp Leu Leu Lys Leu Asn Ser Glu Leu Asn Ile Glu Trp Lys
 900 905 910
 Gln Ala Ile Ser Ser Thr Val Leu Gly Lys Val Ile Val Gln Pro Asp
 915 920 925
 Gln Asn Phe Thr
 930

<210> 76
 <211> 578
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 76

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

ES 2 549 760 T3

Val Ala Glu Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe
 85 90 95
 Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu Ser Gly Gly Val Trp
 100 105 110
 Lys Asp Asn Ile Asn Met Ala Leu Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
 115 120 125
 Gln Leu Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His
 130 135 140
 Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser Glu Val His Cys
 145 150 155 160
 Ile Phe Ser Pro Gln Ile Glu Glu Pro Ser Gln Cys Pro Asp Cys Val
 165 170 175
 Val Ser Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe
 180 185 190
 Ile Asn Phe Phe Val Gly Asn Thr Ile Asn Ser Ser Tyr Phe Pro Asp
 195 200 205
 His Pro Leu His Ser Ile Ser Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp
 210 215 220
 Gly Phe Met Phe Leu Thr Asp Gln Ser Tyr Ile Asp Val Leu Pro Glu
 225 230 235 240
 Phe Arg Asp Ser Tyr Pro Ile Lys Tyr Val His Ala Phe Glu Ser Asn
 245 250 255
 Asn Phe Ile Tyr Phe Leu Thr Val Gln Arg Glu Thr Leu Asp Ala Gln
 260 265 270
 Thr Phe His Thr Arg Ile Ile Arg Phe Cys Ser Ile Asn Ser Gly Leu
 275 280 285
 His Ser Tyr Met Glu Met Pro Leu Glu Cys Ile Leu Thr Glu Lys Arg
 290 295 300
 Lys Lys Arg Ser Thr Lys Lys Glu Val Phe Asn Ile Leu Gln Ala Ala
 305 310 315 320
 Tyr Val Ser Lys Pro Gly Ala Gln Leu Ala Arg Gln Ile Gly Ala Ser
 325 330 335

ES 2 549 760 T3

Leu Asn Asp Asp Ile Leu Phe Gly Val Phe Ala Gln Ser Lys Pro Asp
 340 345 350
 Ser Ala Glu Pro Met Asp Arg Ser Ala Met Cys Ala Phe Pro Ile Lys
 355 360 365
 Tyr Val Asn Asp Phe Phe Asn Lys Ile Val Asn Lys Asn Asn Val Arg
 370 375 380
 Cys Leu Gln His Phe Tyr Gly Pro Asn His Glu His Cys Phe Asn Arg
 385 390 395 400
 Thr Leu Leu Arg Asn Ser Ser Gly Cys Glu Ala Arg Arg Asp Glu Tyr
 405 410 415
 Arg Thr Glu Phe Thr Thr Ala Leu Gln Arg Val Asp Leu Phe Met Gly
 420 425 430
 Gln Phe Ser Glu Val Leu Leu Thr Ser Ile Ser Thr Phe Ile Lys Gly
 435 440 445
 Asp Leu Thr Ile Ala Asn Leu Gly Thr Ser Glu Gly Arg Phe Met Gln
 450 455 460
 Val Val Val Ser Arg Ser Gly Pro Ser Thr Pro His Val Asn Phe Leu
 465 470 475 480
 Leu Asp Ser His Pro Val Ser Pro Glu Val Ile Val Glu His Thr Leu
 485 490 495
 Asn Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Val Ile Thr Gly Lys Lys Ile Thr Lys
 500 505 510
 Ile Pro Leu Asn Gly Leu Gly Cys Arg His Phe Gln Ser Cys Ser Gln
 515 520 525
 Cys Leu Ser Ala Pro Pro Phe Val Gln Cys Gly Trp Cys His Asp Lys
 530 535 540
 Cys Val Arg Ser Glu Glu Cys Leu Ser Gly Thr Trp Thr Gln Gln Ile
 545 550 555 560
 Cys Leu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys His Val His His His His
 565 570 575
 His His

<210> 77

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 549 760 T3

<400> 77

Val Val Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp Gln Leu
1 5 10

5 <210> 78

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 78

Ile Ser Cys Gly Ser Val Asn Arg Gly Thr Cys Gln Arg His Val Phe
1 5 10 15

Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln
20 25

<210> 79

15 <211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

20

Ala Leu Gly Ala Lys Val Leu Ser Ser Val Lys Asp Arg Phe Ile Asn
1 5 10 15

Phe Phe

<210> 80

<211> 12

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

30

Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Lys Asp Gly Phe Met
1 5 10

ES 2 549 760 T3

<210> 81
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 81

Asp Thr Tyr Tyr Asp Asp
 1 5

10 <210> 82
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 82

His Val Phe Pro His Asn His Thr Ala Asp Ile Gln Ser
 1 5 10

<210> 83
 20 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 83

25 Phe Ile Asn Phe
 1

<210> 84
 <211> 8

30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 84

35 Lys Glu Thr Lys Asp Gly Phe Met
 1 5

<210> 85

<211> 24

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 85

```

Tyr Lys Thr Gly Pro Val Leu Glu His Pro Asp Cys Phe Pro Cys Gln
1      5      10      15
Asp Cys Ser Ser Lys Ala Asn Leu
                20

```

10

<210> 86

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 86

```

Cys Phe Pro Cys Gln Asp Cys Ser Ser Lys Ala
1      5      10

```

20

<210> 87

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> misc_feature

30

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

5 <400> 87

Gly Thr Ser Xaa Leu Xaa Ser
1 5

<210> 88

10 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Construcción sintética

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 88

Ser Val Ser Ser Ser Val Xaa Ser Ile Tyr Leu His
1 5 10

25

<210> 89

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

35 <221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 89

10 Xaa Xaa Tyr Xaa Gly Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 90

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25 <220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

30 <400> 90

Trp Ile Tyr Pro Val Thr Gly Asp Thr Tyr Tyr Xaa Glu Xaa Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 91

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 $\langle 220 \rangle$

<223> Construcción sintética

$\langle 220 \rangle$

<221> misc feature

10 $\langle 222 \rangle$ (6)..(6)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 91

15 Gly Tyr Gly Ala Phe Xaa Tyr
1 5

<210> 92

<211> 17

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25 <220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

30 <220>

<221> misc feature

<222> (7)..(8)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

35 <400> 92

Arg Val Asn Pro Xaa Arg Xaa Xaa Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 93

<211> 6

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20

<400> 93

Xaa Asn Xaa Leu Asp Tyr
1 5

25 <210> 94

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> misc_feature

<222> (54)..(54)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (56)..(56)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 94

10

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Thr
20 25 30

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

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

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

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

Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 95

15 <211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Construcción sintética

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(30)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (90)..(91)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (93)..(93)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 95

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Val Xaa Ser Ile
20 25 30

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Tyr Xaa Gly Tyr Pro
85 90 95

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

<210> 96

<211> 115

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

25

<220>

<221> misc_feature

<222> (61)..(61)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

5 <220>

<221> misc_feature

<222> (63)..(63)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (104)..(104)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15 <400> 96

```

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Val Thr Gly Asp Thr Tyr Tyr Xaa Glu Xaa Phe
          50          55          60

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

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

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

Thr Val Ser
          115

```

<210> 97

<211> 114

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (54)..(54)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (56)..(57)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (99)..(99)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>

<221> misc_feature

20 <222> (101)..(101)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 97

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal de c-Met, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena ligera (LCDR) y tres regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR), en el que LCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos SVSSSVSSYLH (SEC ID N° 53), LCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos STSNLAS (SEC ID N° 54), LCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos QVYSGYPLT (SEC ID N° 56), HCDR1 comprende la secuencia de aminoácidos GYTFTDYMH (SEC ID N° 65), HCDR2 comprende la secuencia de aminoácidos RVNPNRRGTTYNQKFEG (SEC ID N° 68), y HCDR3 comprende la secuencia de aminoácidos ANWLDY (SEC ID N° 69).
2. Un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1 que se une a un epítipo dentro de la cadena α de c-Met humano e induce la internalización de c-Met humano de la superficie celular.
3. Un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que induce internalización independiente del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) del c-Met de la superficie celular.
4. Un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une dentro de una secuencia de aminoácidos seleccionada de:
 - a) ¹²¹VVDYYDDQL₁₃₀ (SEC ID N° 77),
 - b) ¹³¹ISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQS₁₅₆ (SEC ID N° 78),
 - c) ¹⁷⁹ALGAKVLSSVKDRFINF₁₉₅ (SEC ID N° 79), y
 - d) ²¹⁶VRRLKETKDGM₂₂₇ (SEC ID N° 80).
5. El anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une dentro de una secuencia de aminoácidos seleccionada de:
 - a. ¹²³DTYYDD₁₂₈ (SEC ID N° 81),
 - b. ¹⁴⁴HVFPHNHTADIQS₁₅₆ (SEC ID N° 82),
 - c. ¹⁹²FINF₁₉₅ (SEC ID N° 83), and
 - d. ²²⁰KETKDGM₂₂₇ (SEC ID N° 84).
6. Un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se une una secuencia de aminoácidos dentro del epítipo conformacional **caracterizado por** ¹²³DTYYDD₁₂₈ (SEC ID N° 81), ¹⁴⁴HVFPHNHTADIQS₁₅₆ (SEC ID N° 82), ¹⁹²FINF₁₉₅ (SEC ID N° 83), and ²²⁰KETKDGM₂₂₇ (SEC ID N° 84) inclusive.
7. Un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una región variable de la cadena ligera (LCVR) y una región variable de la cadena pesada (HCVR), en el que la LCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 5 y la HCVR comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 17.
8. Un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprenda una cadena ligera que tiene una región constante kappa y una cadena pesada que tiene una región constante de cadena pesada de IgG4.
9. Un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende una cadena ligera codificada por la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N° 35, y una cadena pesada codificada por la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N° 47.
10. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende dos cadenas ligeras codificadas por la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N° 35 y dos cadenas pesadas codificadas por la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N° 47.
11. Un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la secuencia de aminoácidos de dicha cadena ligera es idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N° 35; y la secuencia de aminoácidos de dicha cadena pesada es idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de polinucleótidos de

SEC ID N° 47.

- 5 12. Un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y 10, que comprende dos cadenas ligeras, en el que la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera es idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N° 35; y dos cadenas pesadas, en el que la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada es idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N° 47.
13. Un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 29 y una cadena pesada que tiene una región constante de LA cadena pesada de IgG4.
- 10 14. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y 13 que comprende dos cadenas ligeras que tienen la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 29 y dos cadenas pesadas que tienen una región constante de cadena pesada de IgG4.
- 15 15. Una composición farmacéutica, que comprende el anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
16. Un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en terapia.
17. Un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en el tratamiento de cáncer en un ser humano.
- 20 18. Un anticuerpo monoclonal, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho cáncer es cáncer gástrico, de riñón, de colon, colorrectal, de cabeza y cuello, de próstata, melanoma o de pulmón.